



Påverkan av GDNF-RET-signalering i APC-muterat tarmepitel

Nicolas Knuutinen, 40077

nknuutin@abo.fi

Pro gradu-avhandling

Handledare: Saara Ollila, Helsingfors universitet

Åbo Akademis kontakthandledare: Diana Toivola

Fakulteten för naturvetenskap och teknik, Cellbiologi

Våren 2020, Åbo Akademi

ÅBO AKADEMI

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Nicolas Knuutinen, 2020

Påverkan av GDNF-RET-signalering i APC-muterat tarmepitel

Pro gradu-avhandling, 76 sidor

Nyckelord: Tjocktarmscancer, APC, Wnt-signaleringsräckan, GDNF-RET-signaleringsräckan

Abstrakt

Adenocarcinom i tarmen bildas av tarmens epitelceller och orsakar bland annat tjocktarmscancer. Tjocktarmscancer är en av de vanligaste cancerformerna i världen. Aktiveringen av Wnt-signaleringsräckan betraktas oftast som den initierande händelsen i tjocktarmscancer och är förknippad med funktionsförlust av tumörsuppressorgen APC. GDNF-RET-signalering krävs för utveckling av det enteriska nervsystemet men den upprätthåller även tarmepitelcellernas proliferation samt differentiering. Mutationer i GDNF-RET-signaleringsräckans medlemmar har påvisats i olika cancerformer, inklusive medullär sköldkörtelcancer. Eftersom GDNF-RET-signaleringens roll är okänd i tjocktarmscancer var målet med detta pro gradu-projekt att undersöka ifall GDNF-RET-signalering påverkar APC-muterat tarmepitel. Därtill var ett av målen att etablera en stabil APC^{Min/Min}-organoidkultur som modellsystem som efterliknar human tjocktarmscancer. APC^{Min} är en punktmutation i den murina homologen av APC-genen och är en autosomal dominerande allel som kännetecknas av utveckling av flera tarmtumörer. I vidare experiment undersöktes hur GDNF-RET-signalering påverkar APC^{Min/Min}-organoidernas proliferation. Resultaten påvisade att APC-mutanta organoider (APC^{Min/Min}) kan etableras genom att odla dessa först i R-spondin-innehållande medium och senare byta ut till ett medium utan R-spondin som är en Wnt-aktiverare som främjar proliferationen av organoiderna. Resultaten påvisar även att Wnt-signalering är uppreglerad i APC-muterat tarmepitel härstammat från möss medan GDNF-RET-signaleringen inte är förändrad. Med hjälp av metoderna som användes i pro gradu-projektet kunde inte GDNF-RET-signaleringens effekt fastställas på APC^{Min/Min}-organoidernas proliferation. Utgående från experimenten med APC^{Min/Min}-organoiderna kunde inte heller påverkan av GDNF-RET-signalering på APC-muterat tarmepitel avgöras. Fortsatta studier krävs för att undersöka hur GDNF-RET-signalering uttrycks i tarmepitelet samt GDNF-RET-signaleringens roll i tjocktarmscancer.

ÅBO AKADEMI UNIVERSITY
Faculty of Science and Engineering
Nicolas Knuutinen, 2020

Effect of GDNF-RET signaling in APC mutant intestinal epithelium

M.Sc. Thesis, 76 pages

Keywords: CRC, APC, Wnt signaling pathway, GDNF-RET signaling pathway

Abstract

Adenocarcinoma in the intestine is formed by the intestinal epithelial cells and causes, among other things, colorectal cancer (CRC). CRC is one of the most common cancers in the world. Activation of the Wnt signaling pathway is usually the initiating factor in CRC and is associated with loss-of-function of the tumor suppressor gene APC. GDNF-RET signaling is required for the development of the enteric nervous system but also maintains the proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells. Mutations in the members of the GDNF-RET signaling pathway have been observed in various cancers, including medullary thyroid cancer. Since the role of GDNF-RET signaling is unknown in CRC, the aim of this Master's project was to investigate if GDNF-RET signaling has an effect on APC mutated intestinal epithelium. One additional aim was to establish a stable APC^{Min/Min} organoid culture as a model system that mimics human CRC. APC^{Min} is a point mutation in the murine homologue of the APC gene and is an autosomal dominant allele characterized by the development of multiple intestinal tumors. Further experiments investigated how GDNF-RET signaling affects the proliferation of APC^{Min/Min} organoids. The results show that APC mutant organoids (APC^{Min/Min}) can be established by growing them first in R-spondin-containing medium and later replacing it with a medium without R-spondin which is a Wnt activator that promotes the proliferation of the organoids. The results also show that Wnt signaling is upregulated in APC mutant intestinal epithelium derived from mice while GDNF-RET signaling is unchanged. With the methods used in this Master's project, the effect of GDNF-RET signaling on APC^{Min/Min} organoids proliferation could not be determined. Based on the experiments with the APC^{Min/Min} organoids, the effect of GDNF-RET signaling on APC mutant intestinal epithelium could neither be determined. Further studies are needed to investigate how GDNF-RET signaling is expressed in the intestinal epithelium and the role of GDNF-RET signaling in CRC.

Innehållsförteckning

Förkortningar	1
1 Inledning	3
2 Litteraturöversikt.....	4
2.1 Mag-tarmkanalen	4
2.1.1 Mag-tarmkanalens vägg.....	5
2.2 Tarmens anatomi.....	6
2.2.1 Tunntarmen	7
2.2.2 Tjocktarmen	10
2.3 Tarmens nervsystem – enteriska nervsystemet	12
2.4 GDNF-RET-signaleringsräckan.....	13
2.5 Tjocktarmscancer	15
2.6 Wnt-signaleringsräckan.....	17
2.7 APC-genen och dess koppling till cancer	19
2.8 APC ^{Min/+} -mus som modellorganism.....	20
2.8.1 Organoider.....	21
2.9 Adeno-associerat virus (AAV).....	22
3 Målsättningar.....	24
4 Material och metoder	26
4.2 Tunntarm-organoidkultur.....	27
4.2.1 Isolering av tunntarmens kryptceller.....	27
4.2.2 Odling av kryptceller i matrix	28
4.2.3 APCmin-organoider	29
4.3 RNA-extraktion och mätning av genuttrycksnivåer med hjälp av RT-qPCR-metoden	30
4.3.1 RNA-extraktion av tunntarmens tumörvävnad och kontrollvävnad bredvid tumörerna	30
4.3.2 RNA-extraktion av organoider.....	31
4.3.3 Mätning av genuttrycksnivåer med hjälp av RT-qPCR-metoden.....	32
4.5 Immunofluorescens	35
4.5.1 Immunofärgning av mustarmar.....	36
4.6 Statistik.....	38
5 Resultat.....	39
5.1 Undersökning av Wnt- och GDNF-RET-signaleringsmarkörernas genuttryck i APC-muterat tarmepitel	39
5.1.1 Markörerna för Wnt-signaleringsmarkörerna är signifikant uppreglerade i APC-muterat tarmepitel.....	39

5.1.2 GDNF-RET-signaleringsmarkörer i APC-muterat tarmepitel...	40
5.2 Etablering av APC ^{Min/Min} -organoidkultur.....	41
5.3 Uttrycket av Wnt-signalerings- och GDNF-RET-signaleringsmarkörer i APC ^{Min/Min} -sfäroider.....	43
5.4 mRNA-uttrycket av markörer för differentierade celler är nedreglerade i APC ^{Min/Min} -sfäroider.....	45
5.5 Behandling med GDNF och RET-hämmaren Pz-1 har ingen effekt på antalet sfäroider eller deras storlek	46
5.6 mRNA-uttrycket av stamcell- samt epitelcellmarkörer förändras inte i GDNF och Gfa1- eller Pz-1-behandlade sfäroider	48
5.7 Uttrycket av AAV-medierad GFP-signal i tunn- och tjocktarmen	49
5.7.1 Uttrycket av AAV-medierad GFP-signal i tunntarmen	50
5.7.2 Uttrycket av AAV-medierad GFP-signal i tjocktarmen.....	52
6 Diskussion.....	53
6.1 Wnt-signaleringsmarkörer är signifikant uppreglerade i tumörer.....	53
6.2 GDNF-RET-signaleringsmarkörer förändras inte i tunntarmens tumörvävnad.....	54
6.3 Etablering av APC ^{Min/Min} -organoider (sfäroider)	55
6.4 Wnt- och GDNF-RET-signaleringsmarkörer i sfäroider.....	56
6.5 GDNF-RET-signaleringsmarkörer påverkar inte sfäroidernas mängd eller storlek	58
6.6 Stimulering med GDNF-RET-signaleringsmarkörer påverkar inte Wnt-signaleringsmarkörer eller mängden differentierade celler i sfäroider	58
6.7 Skillnader i AAV-serotypernas lokalisering	59
6.8 Slutsatser och fortsatt studie	61
7 Tillkännagivande.....	64
8 Litteraturlista.....	65
Bilaga 1: Kemikalier och ämnen.....	73
Bilaga 2: Recept	75
Bilaga 3: Protokoll	76

Förkortningar

AAV	Adeno-associerat virus
APC	Adenomatös tjocktarmspolypos
ARTN	Artemin
AR	Antigenernas återhämtning
BMP	Benmorfogenesprotein
β3T	Beta III tubulin
cDNA	Komplementärt DNA
ChgA	Kromogranin A
CK1	Kaseinkinas 1
dNTP	Deoxiribonukleotidtrifosfat
Dsh	Disheveld
EEC	Enteroendokrinaceller
EDTA	Etylendiamintetraättiksyra
EGF	Epidermal tillväxtfaktor
ENS	Enteriska nervsystemet
FAP	Familjär adenomatös polypos
GDNF	Gliacellhärledd neurotrofisk faktor
GFL	GDNF-familjligand
GFR	GDNF-familjereceptor
GSK3	Glykogensyntaskinas 3
KMF-PBS	Kalcium- och magnesiumfri fosfatbuffrad saltlösning
KRC	Kolorektalcancer
Lgr5	Leucinrik repeterande innehållande G-proteinkopplad receptor 5
LEF	Lymfoidförstärkare-bindande faktor
LRP	Lipoproteinreceptorrelaterat protein med låg densitet
MgCl	Magnesiumklorid
Min	Multipel tarmneoplasi
mRNA	Budbärar-RNA
NGS	Getserum
noRT	Negativ kontroll för RT-qPCR
NRTN	Neurturin

Nts	Neurotensin
PCR	Polymeraskedjereaktion
PSPN	Persefin
Pygo	Pygopus
rMoMuLV	Rekombinant musleukemivirus
RT-PCR	PCR med omvänd transkription
RT-qPCR	Kvantitativ omvänd transkriptions-PCR
TA-celler	Transitförstärkandeceller
TBS	Trisbuffrad saltlösning
TCF	T-cellfaktor
TGF α	Transformerande tillväxtfaktor alfa
TGF β	Transformerande tillväxtfaktor beta

1 Inledning

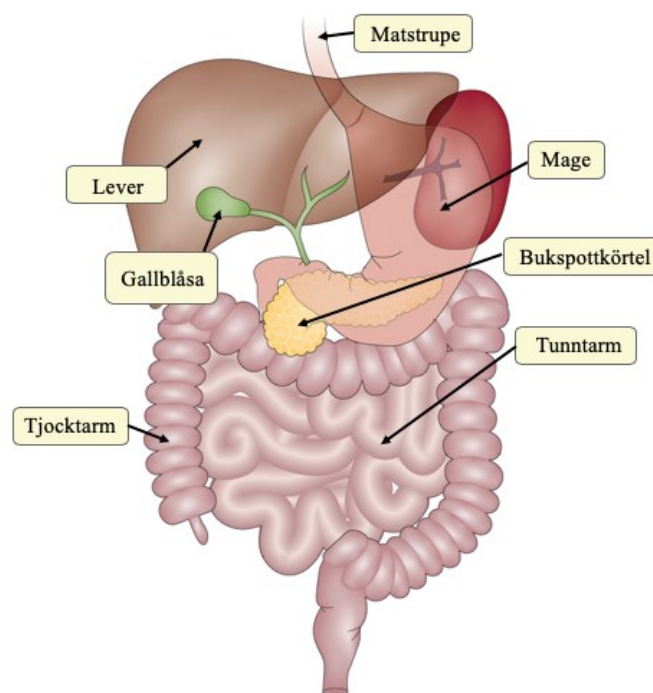
Mag-tarmkanalen är ett organsystem vars uppgift är att bryta ned födan till näringsämnen som tarmen absorberar. Tarmens epitelceller deltar i absorptionsprocessen och tarmen är veckad till kryptor och villi. Stamceller är belägna i basen av kryptorna och bidrar till förnyelsen av tarmepitelet. När stamcellerna delar sig ger de upphov till en kortvarig population av prekursorceller som delar sig snabbt medan de migrerar mot toppen av den centrala lumen. Under migrationen differentieras prekursorcellerna till en av de fyra differentierade celltyperna. Vävnadshomeostas i tarmen upprätthålls av den balanserade uppkomsten av nya celler som ersätter celler som förloras genom naturlig apoptos i epitelskiktet. Mag-tarmkanalen har ett eget nervsystem som kallas för det enteriska nervsystemet (ENS) som kontrollerar tarmens funktioner. Gliacellhärledd neurotrofisk faktor (eng. glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) är ett protein som främjar överlevnaden av neuroner. GDNF, neurturin (NRTN), artemin (ARTN) och persefin (eng. persephin, PSPN) är GDNF-familjeligander (GFL) som signalerar genom tyrosinkinasreceptorn RET. GFL krävs för utvecklingen av flera humana vävnader, men kan även delta i utvecklingen av cancer.

Tjocktarmscancer är bland de vanligaste cancerformerna i världen. Tjocktarmscancer är den näst vanligaste cancerformen hos kvinnor och den tredje vanligaste cancerformen hos män. I tarmen är det ofta onkogen mutationer som aktiverar tumörutveckling. Tjocktarmscancer uppstår genom den så kallade adenom-karcinom-sekvensen var mutationer sker gradvis i specifika onkogener eller tumörsuppressorgener. Aktiveringen av Wnt-signaleringsräckan betraktas som den initierande händelsen i tjocktarmscancer och är förknippat med funktionsförlust av tumörsuppressorgen APC. Över 90 % av alla tjocktarmscancerfall har mutationer i APC-genen. Eftersom påverkan av GDNF-RET-signaleringsväg är okänd i tjocktarmscancer är målet i detta pro gradu-projekt att undersöka hur GDNF-RET-signaleringsväg påverkar APC-muterat tarmepitel. Ett ytterligare mål var att utveckla en metod för att transducera GDNF-överuttryckande plasmid till möss.

2 Litteraturöversikt

2.1 Mag-tarmkanalen

Mag-tarmkanalen är ett organsystem som består av munnen, matstrupen, magen, tarmen samt andra organ som är involverade i matspjälkningen (figur 1). Organen som hör till systemet är bukspottkörteln, levern, gallblåsan och spottkörtlarna. Systemets uppgift är att bryta ned födan mekaniskt samt kemiskt till näringsämnen som tarmen absorberar. Slaggprodukterna som inte absorberas bildas till avföring som passerar genom systemet (Sand et al., 2006). Systemet utsöndrar gastrointestinala hormoner som hjälper till att reglera spjälkningsprocessen av födan. Gastrin, sekretin, cholecystokinin och ghrelin är exempel på sådana hormoner (De la Cour et al., 2007). Mag-tarmkanalen är cirka nio meter lång (Saladin, 2018).



Figur 1. Schematisk figur över mag-tarmkanalen. Mag-tarmkanalen består av munnen, matstrupen, magen, tarmen samt organerna bukspottkörteln, levern, gallblåsan och spottkörtlarna i matspjälkningsprocessen. Figuren modifierad från Szigethy et al., 2018.

Mekaniska bearbetningen av födan påbörjas i munhålan där maten tuggas till mindre bitar, vilket skapar en större yta av födan för enzymerna och ökar enzymernas effektivitet att processera födan. Enzymhaltiga vätskor som produceras av körtelceller

spjälkar näringsämnen. Matspjälkningsvätskorna såsom trypsin och galla produceras av körtlar i mag-tarmkanalens vägg samt av spottkörtlarna, bukspottkörteln och levern som ligger utanför kanalen (Whitcomb & Lowe, 2007). Jonsammansställningen och pH-värde är anpassade till specifika enzymer som finns i olika delarna av mag-tarmkanalen. Största delen av joner och enzymer absorberas från födan när de har spjälkats till aminosyror. Näringsämnen ur födan spjälks till små molekyler och absorberas tillsammans med vatten, vitaminer och joner från mag-tarmkanalen till cirkulations- eller lymfsystemet. (Sand et al., 2006).

2.1.1 Mag-tarmkanalens vägg

Största delen av mag-tarmkanalens följer den grundläggande strukturen med en vägg som består av följande vävnadsskikt i ordning från lumen till den yttre ytan: mukosa, submukosa, muscularis externa och serosa. Det innersta skiktet i mag-tarmkanalen, mukosan, består ytterligare av tre skikt: ett inre epitel, ett bindvävsskikt (lamina propria) och ett tunt lager av glatt muskulatur som kallas för muscularis mucosae. Epitelskiktet är enskiktat cylinderepitel i majoriteten av mag-tarmkanalen, förutom i munhålan, matsrupen och i nedre delen av analkanalen var epitelet är flerskiktat skivepitel. Epitelskiktet utgör en barriär och skyddar mot den yttre miljön. Epitelcellerna är förenade med varandra med täta cellförbindelser (eng. tight junctions). Förutom att epitelcellerna har en skyddande funktion är de specialiserade i att delta i absorptionsprocessen, producera matspjälkningssekret eller hormoner som reglerar matspjälkningsprocessen. Bindvävsskiktet innehåller blodkärl, lymfkärl, lymfvävnad och nervfibrer. Näringsämnen som har förflyttats genom epitelskiktet transporteras vidare via blodet eller lymfvätskan. Dessutom skyddar bindvävsskiktet blodsystemet från mikroorganismer som har kommit igenom epitelskiktet. Det glatta muskulaturskiktet spänner mukosat, vilket skapar fördjupningar som förbättrar ytarean samt kontakten med födan. Detta förbättrar matspjälkningens effektivitet och absorptionen av näringsämnen (Saladin, 2018).

Ovanpå mukosa finns submukosa som är ett tjockare skikt av bindvävnad. I likhet med mukosas bindvävsskikt innehåller submukosan blodkärl samt lymfkärl och på vissa ställen körtlar som utsöndrar slem in i lumen. Därtill finns det ett nätverk av nervceller

i submukosan. Muscularis externa består av två lager av muskler, ett inre cirkulärt skikt och ett yttre längsgående skikt. Cellerna i det inre skiktet omkretsar kanalen medan cellerna i det yttre skiktet löper i längsriktningen av kanalen. På vissa ställen förtjockas det cirkulära lagret för att bilda ringmuskler som reglerar födans genomgång genom mag-tarmkanalen. Transport- och blandningsrörelser i mag-tarmkanalen ansvaras av muskelcellerna. Muscularis externa innehåller också ett nätverk av nervceller och bildar tillsammans med nätverket som finns i submukosan det enteriska nervsystemet (ENS) genom att bilda synapser med varandra (Saladin, 2018). ENS reglerar bland annat mag-tarmkanalens epitelbarriärpermeabilitet (Neunlist et al., 2003). Det yttersta skiktet serosa består av ett tunt bindvävsskikt täckt av enkelt skivepitel som kallas för mesotel. Serosan börjar i den nedre delen av matstrupen och slutar lite före ändtarmen. Svalget, majoriteten av matstrupen och ändtarmen saknar serosa men är omgivna av ett fibröst bindvävsskikt (adventitia) (Saladin, 2018).

2.2 Tarmens anatomi

Vävnadshomeostas beror strikt på den balanserade uppkomsten av nya celler som ersätter celler som förloras genom naturlig apoptos eller vävnadsskada. Denna process av vävnadsregenerering drivs av små populationer av stamceller som definieras av deras unika förmåga att förnya sig genom självförnyelse samtidigt som de ger upphov till de specialiserade celltyperna för den relevanta vävnaden (Spit et al., 2018). Extracellulära signaler som tillhandahålls av närbelägna nischceller, interagerar lokalt med stamceller för att reglera deras öde genom att aktivera specifika signalräckor (Van es et al., 2018).

Den kontinuerliga förnyelsen av tarmepitelet gör att celler mot slutet av deras livstid fälls av vid spetsen av villus (tunntarmen) eller epitelskiktet (tjocktarmen), medan nyproducerade och differentierade celler migrerar upp och återbildar epitelbarriären (Leblond & Stevens, 1948). Denna oändliga processen upprätthålls genom symmetrisk celldelning av stamceller som ligger vid kryptbasen (Snippert et al., 2010). Nydelade dotterceller från stamcellen ger först upphov till de prekursorceller som delar sig snabbt, även känd som transitförstärkandeceller (eng. transit amplifying cells, TA-celler), som differentieras senare till specifika cellinjer i epitelet

som krävs för epitelomsättningen. TA-cellerna vandrar uppåt samtidigt som de differentieras till de specialiserade epitellinjerna. Kryptor, även kallad Lieberkühns kryptor, är körtlar som existerar både i tunntarmen och tjocktarmen. Tunntarmen består av fingerliknande utsprång, villi, som omger kryptornas öppningar. Både kryptor och villi täcks av epitel som består av flera celltyper (Van es et al., 2019). Tarmens epitelskikt räknas till ett av de mest intensivt självförnyande organen. Inom 5 dagar förnyas hela epitelskiktet (Tian et al., 2011). Både tunntarmen och tjocktarmen absorberar och utsöndrar vätska samt elektrolyter, medan endast tunntarmen tar upp näringsämnen (Boron & Boulpaep, 2012).

2.2.1 Tunntarmen

Tunntarmen är hos människan cirka 5 meter lång och består av funktionellt distinka områden inklusive duodenum (tolvfingertarmen), jejunum (tomtarmen) och ileum (krumtarmen) (Saladin, 2018). Tunntarmens huvudsakliga uppgift är att absorbera näringsämnen och mineraler (Kiela & Ghishan, 2016). Tunntarmen rör sig fritt i bukhålan förutom duodenum som är fäst med tarmkäck. Tunntarmens yta innefattar ett mycket veckat epitel av villi och kryptor (figur 2). Cellerna som täcker villi anses vara ansvariga för absorption medan kryptcellerna deltar främst i utsöndring. Den enorma cellproduktionshastigheten i kryptorna balanseras av apoptos i toppen av villi. Det uppskattade antalet stamceller är mellan fyra och sex per krypta (Barker et al., 2007).

För närvarande har flera populationer av intestinala stamceller karakteriserats på basen av deras markörer och lokalisering i kryptorna. Bland dessa är de snabbdelande stamcellerna i basen av kryptorna som unikt uttrycker markören leucinrik repeterande innehållande G-proteinkopplad receptor 5 (eng. leucine-rich-repeat containing G-protein coupled receptor 5, Lgr5). Lgr5 har bekräftats som en stamcellsmarkör (Yan et al., 2012). De Lgr5-positiva stamcellerna som delar sig varje dag anses som drivkraften för tarmvävnadsförnyelse. Dessutom har det identifierats en långsamt delande reservstamcellpopulation, även kallad position 4/+4-celler, enligt deras position i kryptor. Reservstamcellpopulationen anses innefatta stamceller i ett vilotillstånd (eng. quiescence) som mobiliseras vid vävnadsskada (Buczacki et al., 2013; Yan et al., 2012). En process kallad för neural konkurrens (eng. neutral competition) skjuter slumpmässigt hälften av de Lgr5-positiva ut ur stamcellnischen

för att bli TA-celler (Snipper et al., 2010). Balansen mellan uppkomsten av nya celler och deras specialisering regleras av många signalräckor, som kontrollerar stamcellernas underhåll och tarmarkitekturen. Bland dessa är Wnt/ β -katenin-, Notch-, Hedgehog, benmorfogenesprotein- (BMP), Epidermal tillväxtfaktor- (eng. epidermal growth factor, EGF) och Eph-efrin-signalräckan. Wnt-signalering anses vara den centrala signalräckan som upprätthåller stamcellsproliferation, kontrollerar cellpositionering inom kryptor samt aktiverar differentiering av panethceller (Spit et al., 2018; Van es et al., 2019).

Tunntarmens epitel består av fyra distinkta celltyper: absorptiva enterocyter och tre sekretoriska linjer bestående av slemutsöndrande bägarceller, hormonutsöndrande enteroendokrinaceller och antimikrobiella peptidutsöndrande panethceller (Shroyer et al., 2005). Epitelet består även av en femte celltyp, tuft-celler som fungerar som sensorer för luminalinnehåll och initierar immunsystemet mot maskinfektioner (Gerbe et al., 2016; Spit et al., 2018).

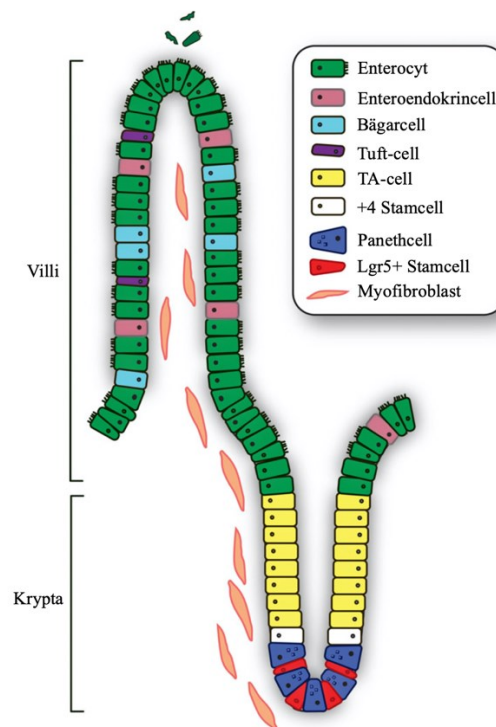
Bland de differentierade celltyperna utgör de näringsabsorberande enterocyterna majoriteten av cellerna som täcker villi. Enterocyter är absorberande celler som har tätt packade mikrovillin på deras ytor. Mikrovillin ökar cellytan, vilket underlättar absorptionen och utsöndringen av näringsämnen över epitelet. Enterocyterna absorberar näringsämnen från tarmen genom att producera hydrolytiska enzymer såsom maltas (King et al., 1983; Van de Flier & Clevers, 2009).

Bägarceller (eng. goblet cells) utsöndrar det skyddande slemämnet mucin. Slemskiktet som täcker epitelet utsöndras därmed av bägarcellerna och främjar eliminering av tarminnehåll samt tillhandahåller den första försvarslinjen mot fysisk och kemisk skada. Bägarcellers cellmembran innehåller mikrovilli, vilket möjliggör utsöndring av slem på en större yta. Störning i tarmhomeostas orsakar en bristfällig slembarriär med en ökad permeabilitet på grund av att de täta cellförbindelserna drabbas, vilket i sin tur kan leda till inflammation och skada cellerna i mukosan (Kim & Ho, 2010; Liévin-Le Moal & Servin, 2006).

Enteroendokrinaceller (EEC) styr ett brett spektrum av fysiologiska processer kopplade till metabolismen. Tarmens EEC utgör det största hormonproducerande

organet hos däggdjur. EEC klassificeras enligt deras hormonprodukter som reglerar både endokrint och parakrint. Hormonerna reglerar proliferationen av diverse celltyper i tarmen genom att signalera till neuroner och andra celltyper i tarmens vägg. Det finns mer än 15 subtyper av enteroendokrinaceller. Exempel på EEC är enterokromaffina celler som utsöndrar serotonin, en reglerare för tarmens rörelse, somatostatin-producerande D-celler, neurotensin-producerande N-celler och sekretin-producerande S-celler (Beumer et al., 2018).

Panethceller förmedlar nischsignaler och upprätthåller stamceller genom att uttrycka EGF, transformerande tillväxtfaktor alfa (eng. transforming growth factor alpha, TGF- α), proteinet Wnt3 och Notch-liganden Dll4. Dessutom är panethceller kända för att producera bakteriedödande produkter såsom lysozym. Panethceller undviker det uppåtgående cellflödet och är den enda differentierade tarmepitelcelltypen som migrerar nedåt för att utgöra en nisch för stamcellerna vid kryptbasen. Panethceller finns endast i tunntarmen och utgör en del av det medfödda immunförsvaret (Sato et al., 2010; Van es et al., 2019). Panethceller har en mycket längre livslängd än de differentierade epitelcellerna i villi (Van de Flier & Clevers, 2009).

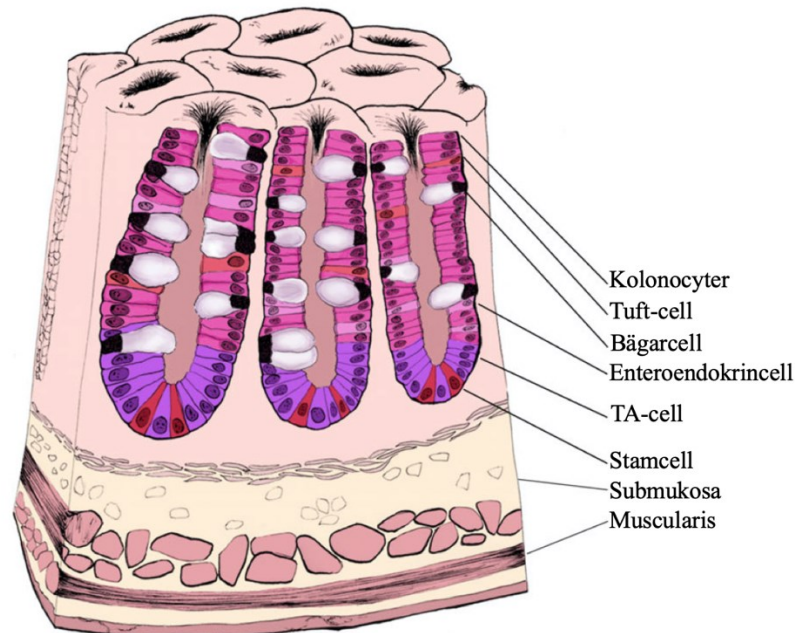


Figur 2. Anatomin i tunntarmen. Tunntarmen består av villi och kryptor. Aktivt delande Lgr5-positiva (Lgr5+) stamceller är belägna längst nere i kryptorna blandat med panethceller. Stamcellerna ger upphov till transitförstärkandeceller (TA-celler) som är prekursorer till de specialiserade epitelcellerna. Stamcellerna vid position 4 (+4 stamcell) mobiliseras vid vävnadsskada. Det mogna epitelet i villi är sammansatt av bägarceller, enteroendokrinaceller, enterocyter och tuft-celler. De apoptotiska cellerna fälls av vid spetsen av villus och förnyas av nya celler. Figuren modifierad från Spit et al., 2018.

2.2.2 Tjocktarmen

Tjocktarmen är i likhet med tunntarmen också veckad och innehåller därmed också kryptor; dock saknar den villi och har därför en mera plan yta. Tjocktarmen täcks av epitelceller och utspritt på epitelytan finns det öppningar av kryptor som har samma funktion samt struktur som tunntarmens kryptor. Ytepitelcellerna i tjocktarmen är de primära cellerna som är ansvariga för absorption, medan kryptcellerna medierar jonsekretion (Boron & Boulpaep, 2012). Tjocktarmens epitel består huvudsakligen av samma differentierade epitelceller som tunntarmen, dessa inkluderar enterocyter som kallas för kolonocyter i tjocktarmen, enteroendokrinaceller, bägarceller och tuft-celler (figur 3). Kolonocyter och bägarceller är de huvudsakliga differentierade celltyperna i tjocktarmen. Panethceller är dock unika för tunntarmen och saknas i tjocktarmen (Allaire et al., 2018). Det finns nästan dubbelt så mycket bägarceller i tjocktarmen

som i tunntarmen. Detta beror på att det behövs mera mukus som utsöndras av bägarcellerna för att skydda mot den större mängden av bakterier som finns i tjocktarmen (Kim & Ho, 2010).



Figur 3. Anatomin i tjocktarmen. Tjocktarmen saknar villi-strukturen och består endast av kryptor. Vid basen av kryptorna finns Lgr5 positiva stamceller, följt av mognande prekursorceller (TA-celler) och moget epitel. Det mogna epitelet består av differentierade epitelceller med en hög andel av bägarceller. Figuren modifierad från Fair et al., 2018.

Tjocktarmen är den sista delen av mag-tarmkanalen och är hos människan cirka 1,5 meter lång (Kiela & Ghishan, 2016). I människan börjar tjocktarmen efter ileoceckalklaffen som är slutmuskeln mellan tunntarmens ileum och tjocktarmen. Slutmuskelnns uppgift är att begränsa återflöde av tjocktarmens innehåll in i tunntarmen (Pollard et al., 2011). Tjocktarmens första del är caecum, eller blindtarmen, samt blindtarmsbihanget (appendix vermiformis) som är en utväxt från blindtarmen. Caecum är 10 cm lång och är ansluten till tunntarmen. Efter caecum fortsätter grovtarmen, eller kolon, som är tjocktarmens huvudsakliga beståndsdel. Den sista delen av tjocktarmen är ändtarmen (rectum) som är cirka 10 cm lång, och mynnar i analkanalen (canalis analis). Analkanalen är cirka 4 cm lång. Kolons huvudsakliga uppgifter är att absorbera natrium och vatten genom aktiv transport. Största delen av tjocktarmen består av grovtarmen som kan indelas i fyra segment: den uppåtstående

tjocktarmen (colon ascendens), tvårgående tjocktarmen (colon transversum), nedåtgående tjocktarmen (colon descendens) och s-formiga tjocktarmen (colon sigmoideum) (Khashab et al., 2009; Sand et al., 2006).

Tjocktarmen har en riklig bakterieflora som dessutom är en del av immunförsvaret. Bakteriernas uppgift är att syntetisera K-vitamin och vissa B-vitaminer. Eftersom vi vanligtvis intar för lite K-vitamin med maten för att upprätthålla en fungerande koagulation av blodet är produktionen av K-vitamin ytterst viktigt. Bakterierna har dessutom som uppgift att bryta ned kolhydrater som resten av matspjälkningssystemet inte kan, bland annat cellulosa. Till skillnad från tunntarmen saknar tjocktarmen ett kontinuerligt muskelskikt. I stället för ett längsgående muskelskikt har tjocktarmen muskelceller i tre separata, robusta och parallella muskelband, taenia coli, som befinner sig på jämna avstånd från varandra. Tjocktarmens körtlar producerar slemartad vätska som smörjer tarminnehållet samt skyddar epitelcellerna (Sand et al., 2006).

2.3 Tarmens nervsystem – enteriska nervsystemet

Mag-tarmkanalen skiljer sig från andra perifera organ genom att den har ett nervsystem, ENS som kan kontrollera tarmens funktioner (Bayliss & Starling, 1899). ENS består av ett komplext nätverk av nerv- och gliaceller som reglerar mag-tarmkanalens nervsystem autonomt (Woley et al., 2000). En stor mängd nervvävnad, som utgör ENS, är inbäddad i mag-tarmkanalens vägg. Inom ENS är nervceller och gliaceller grupperade i små kluster, de enteriska ganglierna. Dessa ganglier är sammankopplade med axoner. Det finns 15 typer av neuroner i tunntarmen och ytterligare i tjocktarmen. De enteriska nervcellerna härstammar från prekursorceller som migrerar från neurallisten. ENS är uppdelat i två nervnät i tarmen: det myenteriska (Auerbachs plexus) och det submukosa (Meissners plexus). De myenteriska nervnätet är beläget mellan det inre och yttre muskelskiktet av muscularis och bildar ett kontinuerligt nätverk som sträcker sig från matstrupen till rektum. De submukösa nervnätet finns i submukosan i tunn- och tjocktarmen och i magen. Dock innehåller nervnätet i magen endast få ganglier (Furness, 2006).

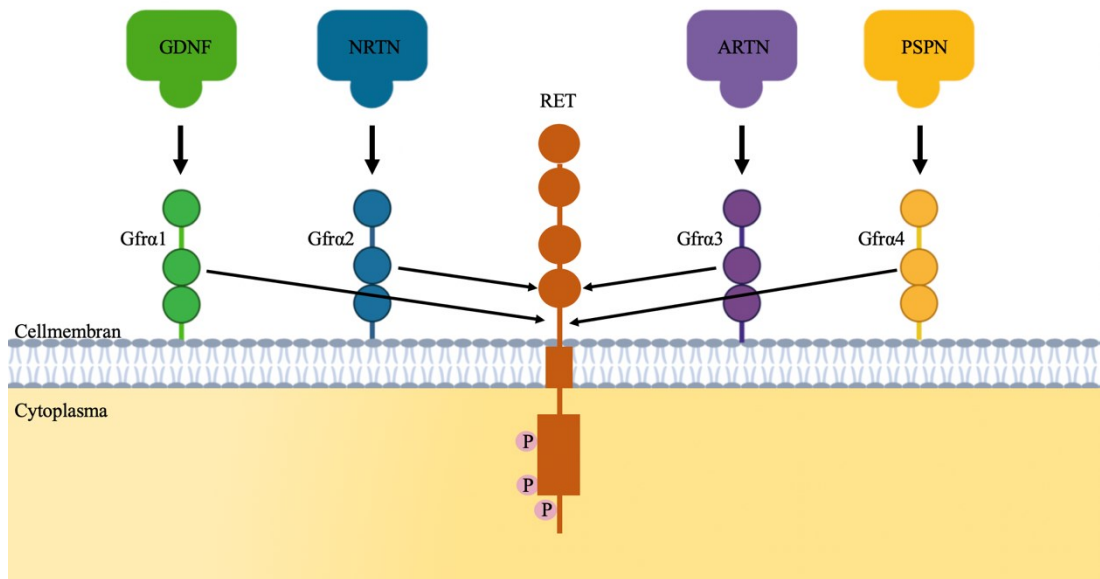
ENS är till en stor del ansvarigt för tarmkanalens blodflöde, motoriska och sekretoriska aktivitet, såsom tarmens muskelrörelse, vätske- samt elektrolytutsöndring. Det myenteriska nervnätet ansvarar för tarmrörelser medan det submukosa nervnätet reglerar jon- och vattentransporten. Dessutom är ENS involverat i regleringen av immun- och inflammatoriska processer. ENS kommunicerar också med många andra celltyper, inklusive endokrina, epitel- och immunceller för att påverka olika fysiologiska svar i tarmen (Furness, 2006; Rao & Gershon, 2018).

2.4 GDNF-RET-signaleringsräckan

Neurotrofiner är en familj av neurotrofiska faktorer som ursprungligen identifierats som överlevnadsfaktorer för sensoriska och sympatiska neuroner och har sedan dess visats medverka i regleringen av tillväxt, överlevnad och differentiering av neuroner i både perifera och centrala nervsystemet (Reichardt, 2006). Gliacellhärledd neurotrofisk faktor (eng. glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) är ett protein som främjar överlevnaden av neuroner. Opublicerat data från Ollilas forskningsgrupp har påvisat att GDNF uttrycks av tarmens myofibroblaster. GDNF bildar tillsammans med neurturin (NRTN), artemin (ARTN) och persefin (eng. persephin, PSPN) en ny familj av neurotrofiska faktorer som är strukturellt relaterade till transformerande tillväxtfaktorn beta (eng. transforming growth factor beta, TGF β) (Airaksinen & Saarma, 2002). GDNF, ARTN, NRTN, och PSPN är GDNF-familjeligander (GFL) som signalerar genom tyrosinkinasreceptorn RET, en välkaraktiserad proto-onkogen (figur 4) (Gattei et al., 1997). GFL är neurotrofiska faktorer som krävs för utvecklingen av flera humana vävnader, men dessa faktorer kan också delta i utvecklingen av cancer i människan. Medan alla GFL signalerar genom RET, medieras bindningen och specificiteten genom interaktioner med GDNF-familjereceptorer (GFR) på cellytan. Bland GFR medierar GFR α 1 signalering av GDNF, GFR α 2 förmedlar NRTN-signalering, GFR α 3 ARTN-signalering och GFR α 4 PSPN-signalering. Utöver att affiniteten är högst mellan specifika GFL och deras föredragna GFR, finns det en viss grad av korspecificitet (eng. cross-specificity) mellan liganderna och receptorerna. Utvecklingen av ENS är beroende av GDNF:s verkan på prekursorceller härledda ur neurallisten i den embryonala tarmen. Förlust av GDNF-genen orsakar en dramatisk defekt i ENS som kännetecknas av förlust av enteriska nervceller (Worley, 2000).

På samma sätt som andra tyrosinkinasreceptorer, kan RET aktivera ett antal signalräckor inklusive AKT1, NF- κ B och MAPK/ERK som är viktiga för cellöverlevnad, proliferation och differentiering (Naughton et al., 2006; Takahashi, 2001). RET består av tre domäner; en extracellulär domän, en transmembran domän och en intracellulär domän som innehåller tyrosinkinasdomänen. Den extracellulära domänen innehåller signalpeptiden och kadherinliknande- samt cysteinrika regioner. Kalciumbindning krävs för RET-proteinets funktionella integritet och för dess förmåga att samverka med liganderna. Mutationer i RET-genen kan orsaka funktionsförlust i RET-proteinet och dessa är förknippade med Hirschsprungs sjukdom. Däremot om mutationer i RET-genen orsakar att RET överaktiveras (eng. gain-of function mutation) är förändringen förknippad med tumörutveckling av olika typer, inklusive medullär sköldkörtelcancer och multipel endokrin neoplasi (Anders et al., 2001).

RET-signalering krävs för att upprätthålla olika stamceller inklusive neuronala-, njurens-, lymfoida-, hematopoietiska stamceller och spermatocyter. I dessa celler är RET-signalering involverat i ett brett spektrum av utvecklingsprocesser såsom proliferation, migration och differentiering. RET-signalering har även en roll i tarmen. RET främjar differentieringen av celler och Wnt-signalering i den utvecklande tarmens epitelceller. Slutligen, upprätthåller RET proliferationen av både enteriska neuroner och epitelprekursorceller. Dessutom uttrycks RET av vissa enteroendokrina- och enterokromaffina celler i tarmepitelet (Perea et al., 2017). GDNF-RET-signaleringens roll är inte fullständigt klargjord i tjocktarmscancer (Luo et al., 2013).



Figur 4. Schematisk översikt över GDNF-RET-signaleringsräckan. GDNF-familjeliganderna GDNF, Neurturin (NRTN), Artemin (ARTN) och Persefin (PSPN) signalerar via GDNF-familjreceptorerna Gfra α 1–4 till tyrosinkinasreceptorn RET. RET är uppbyggt av tre domäner; en extracellulär-, en transmembran och en intracellulär domän. GDNF-RET-signaleringsväg aktiverar nedströms signalering såsom AKT1- och MAPK/ERK-signaleringsvägarna.

2.5 Tjocktarmscancer

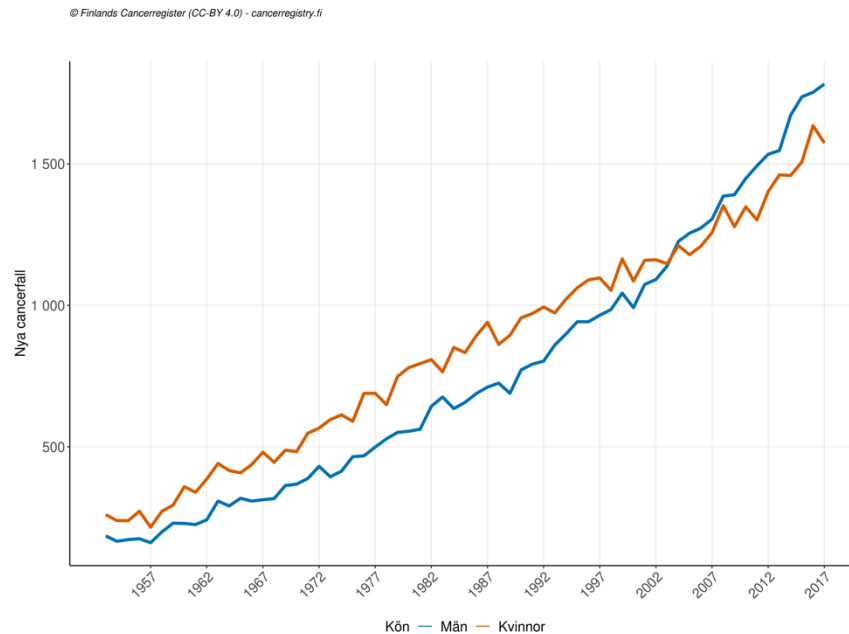
Tjocktarmscancer, eller kolorektalcancer (KRC) är bland de vanligaste cancerformerna och utgör nästan 9 % av alla cancerfall i världen (figur 5) (Ghoncheh et al., 2016). År 2012 drabbades cirka 1,4 miljoner människor över hela världen av KRC och nästan 700 000 fall ledde till dödsfall (Arnold et al., 2016). KRC har hög prevalens i Australien, Nya Zeeland, Kanada, USA och Europa och har mindre incidensrisk i länder som Kina och Indien (Ghoncheh et al., 2016). Efter bröstcancer är KRC den vanligaste cancertypen hos kvinnor. Hos män är lung- samt prostatacancer de mest förekommande cancertyperna medan KRC är den tredje vanligaste cancertypen. KRC förekommer ofta hos kvinnor och män äldre än 50 år. Kolorektala tumörer är kända för att uppstå genom den så kallade adenom-karcinom-sekvensen. Inaktiverande mutationer i tumörsuppressorgener och aktiverande mutationer i onkogenor orsakar omvandling av normalt epitel till bildandet av godartade neoplasmer (adenom och polyper). Ytterligare mutationer främjar utvecklingen av mera avancerade neoplasmer och slutligen omvandlar tumörerna till invasiva karcinom (Fodde, 2002). Mutationer i bland annat generna APC, K-RAS och p53 har påvisats att främja utvecklingen av KRC från tidigt adenom till metastaserande karcinom

(Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein et al., 1988). KRC utvecklas från benigna tumörer som kallas för adenom. Adenom har sitt ursprung i körtelvävnad (epitelvävnad) och förekommer som polyper på mukosan. Nittio procent av KRC-fallen härstammar från adenokarcinom som är en malign typ av karcinom och bildas av epitelceller på tjocktarmens yta genom polyper. Andra sällsynta typer av kolorektala karcinom inkluderar neuroendokrin, skivepitel, adenoskvamös och spindelcell (Fleming et al., 2012; Markowitz, & Bertagnolli, 2009). Mer än 70 % av KRC-relaterade dödsfall orsakas av metastaser i levern som har sitt ursprung från KRC (Munro et al., 2017). Faktorer som ökar risken för KRC är ofta livsstilsfaktorer, såsom brist på motion, alkoholkonsumtion, tobak, icke-steroida anti-inflammatoriska läkemedel, fetma, dålig kost som innehåller rikligt med animaliska fetter och rött kött (Giovannucci, 2002). Dessutom ökar risken för KRC också av kroniska tarmsjukdomar, som ulcerös kolit och Crohns sjukdom (Gillen et al., 1994). Cirka 5–10 % av KRC-fallen har ett genetiskt ursprung men de flesta fallen utvecklas sporadiskt (Ghoncheh et al., 2016). De två bäst definierade familjära distinkta syndromen med predisposition för KRC är familjär adenomatös polypos (FAP) och ärftlig icke-polypos KRC (Bertario et al., 1999).

Medan kirurgi kan vara potentiellt botande, kan mindre än 25 % av fallen opereras med återfallsnivåer upp till 70 %. Icke-opererbara återkommande eller metastatiska KRC behandlas vanligtvis genom palliativ kemoterapi. Palliativ kemoterapi är en behandling utformad för terminala cancerpatienter för att förlänga överlevnaden och underlätta symptom men inte bota sjukdomen (Neo et al., 2010; Munro et al., 2017). KRC begränsad till tarmväggen (stadie I och II) är potentiellt botliga på grund av tidig upptäckt och behandling. Patienterna har en 5-årig överlevnad på mellan 70 % och 90 %, men de flesta länder har inte ett screeningprogram som möjliggör tidig upptäckt. Däremot är den genomsnittliga 5-åriga överlevnaden för regional (stadie III) och metastaserande (stadie IV) KRC cirka 50 % – 70 % respektive 10 % – 14 % (Markowitz, & Bertagnolli, 2009).

Även om det har skett betydande framsteg inom cancerforskning och medicinsk behandling ökar antalet individer som diagnostiseras med cancer varje år. Till en stor del beroende på åldrande och befolkningstillväxt har antalet överlevnaden stigit. Den

globala bördan av KRC förväntas öka från 2016 med 60 % till mera än 2,2 miljoner nya fall och 1,1 miljoner dödsfall år 2030 (Arnold et al., 2016).



Figur 5. Antalet nya kolorektalcancerfall mellan åren 1957 och 2017 i Finland. Mängden kolorektalcancerfall (KRC-fall) har ökat dramatiskt i Finland både hos män och kvinnor under de senaste årtiondena. Den blåa linjen visar antalet KRC-fall hos män medan den röda linjen visar antalet KRC-fall hos kvinnor. Figuren tagen från webbsidan: <https://cancerregister.fi/statistik/cancerstatistik/>, den 09.01.2020.

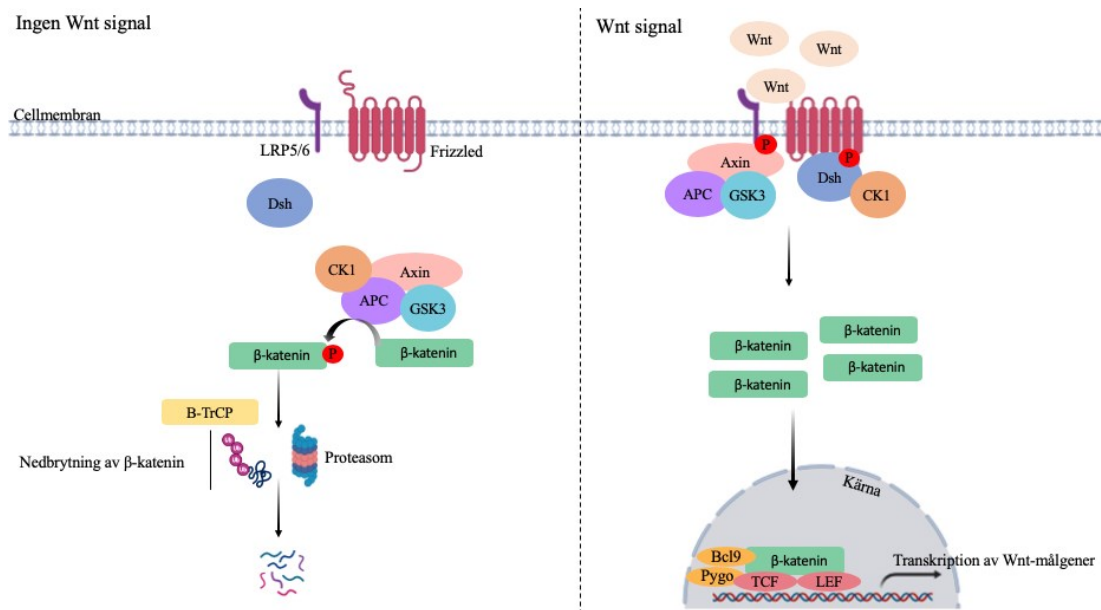
2.6 Wnt-signaleringsräckan

Wnt-signaleringsräckan är en konserverad signaleringsräcka som reglerar cellmigration, cellpolaritet, cellöde, neurulation samt organogenes under embryonisk utveckling. Dessutom är signaleringsräckan inblandad i stamcellernas förnyelse (Komiya & Habas, 2008). Wnt-signaleringsräckorna signalerar genom extracellulära ligander, Wnt-ligander, som är glykoproteiner som binder och aktiverar receptorer på cellytan. Dessa receptorer aktiverar i sin tur intracellulära processer som leder till signalkaskader. Namnet Wnt är en sammanslagning av de homologa generna Wingless hos *Drosophila melanogaster* och Int-1 hos vertebraterna (Clevers & Nusse, 2012). Wnt-signaleringsräckan inkluderar en kanonisk eller Wnt/ β -kateninberoende signaleringsräcka och en icke-kanonisk eller Wnt/ β -kateninoberoende signaleringsräcka, som kan ytterligare delas in i den plana cellpolaritet- (eng planar

cell polarity) och Wnt/Kalcium-signaleringsräckan (Komiya & Habas, 2008). Wnt-ligander ändras till signaler i den kanoniska signaleringsräckan för att bestämma cellulära funktioner såsom cellens öde, förnyelse av stamceller och organogenes (Katoh & Katoh, 2007).

Vid frånvaro av Wnt-signaleringsräckan i den kanoniska signaleringsräckan riktar β -katenin till ett nedbrytningskomplex med proteinerna Axin, adenomatös tjocktarmspolypos (eng. adenomatous polyposis coli, APC), glykogensyntaskinas 3 (eng. glycogen synthase kinase 3, GSK3) och kaseinkinas 1 (eng. casein kinase 1, CK1) som fosforylerar β -kateninet (figur 6). Detta uppnås genom CK1- och GSK3-medierad fosforylering. Fosforylering av β -katenin orsakar ubikvitinering och nedbrytning i proteasomer medierade av β -TrCP (Rao & Kuhl, 2010).

När Wnt-signaleringsräckan är aktiverad ansamlas β -katenin i cytoplasmat och translokeras sedan in till kärnan och fungerar där som en transkriptionell ko-aktiverare (figur 6). Den β -kateninberoende signaleringsräckan utlöses av bindningen av Wnt-ligander till lipoproteinreceptorrelaterat protein med låg densitet (eng. low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP) 5 och 6 samt till Frizzled-receptorn. LRP- och Frizzled-receptorerna fosforyleras på grund av bindningen av Wnt-ligander som i sin tur fosforylerar proteinet Disheveled (Dsh), vilket orsakar rekrytering av komplexet som består av Axin, APC, GSK3 och CK1 till receptorerna. Komplexet hämmar cytosolisk GSK3 att fosforylera β -katenin. Det ofosforylerade β -kateninet ackumuleras i cytosolen som migreras till kärnan och interagerar där med T-celfaktorn (eng. T cell transcription factor, TCF), lymfoidförstärkare-bindande faktorn (eng. lymphoid enhancer-binding factor, LEF) samt ko-aktiverande Pygopus (Pygo) och Bcl-9. Detta leder till en aktiv transkription av Wnt-målgener såsom c-Myc, cyklin D1 och p21 (Gordon & Nusse, 2006; Krishnamurthy & Kurzrock, 2018). Lgr5 är en markör för tarmens stamceller men även en målgene av Wnt-signaleringsräckan. Lgr5 och dess homologer fungerar som receptorer för R-spondin-proteinfamiljen som är Wnt-signalerings agonister. Lgr5 och R-spondin främjar och ökar Wnt/ β -kateninberoende signaler (Carmon et al., 2012).



Figur 6. Wnt-signaleringsräckan. I frånvaro av Wnt-signalering (vänster) fosforylerar nedbrytningskomplexet med Axin, adenomatös tjocktarmspolyp (eng. adenomatous polyposis coli, APC), glykogensyntaskinas 3 (eng. glycogen synthase kinase 3, GSK3) och kaseinkinas 1 (eng. casein kinase 1, CK1) cytosoliskt β -katenin. Fosforylerat β -katenin riktar sedan för ubiquitinerings och nedbrytning av proteasomer medierad av β -TrCP. Vid aktiv Wnt-signalering (höger) binder Wnt-ligander till Frizzled- och LRP5/6-receptorerna som inducerar fosforylering av LRP5/6- och Frizzled-receptorerna. Dishevelled (Dsh) fosforyleras och komplexet med Axin, APC, GSK3, CK1 rekryteras till receptorerna. Komplexet hämmar cytosolisk GSK3 och CK1 att fosforylera β -katenin, vilket leder till ansamling av cytosoliskt β -katenin. Ackumulerat β -katenin translokeras sedan till kärnan och interagerar där med T-celfaktor (eng. T cell transcription factor, TCF) och lymfoidförstärkare-bindande faktor (eng. lymphoid enhancer-binding factor, LEF) samt ko-aktiverare Pygopus (Pygo) och Bcl-9 som aktiverar transkription av Wnt-målgene. Figuren gjord i <https://app.biorender.com>.

2.7 APC-genen och dess koppling till cancer

I tarmen är det ofta onkogen mutationer som aktiverar tumörinitiering och progression. Sådana mutationer påverkar ofta komponenter i evolutionärt välbevarade signalräckor som ligger till grund för upprätthållandet av tarmepitelet. Exempelvis är aktiviteten hos Wnt-signaleringsräckan i den normala tarmen begränsad till stamceller där Wnt-signaleringsräckan upprätthåller homeostas samt cellproliferation. I tarmadenom som är en godartad föregångare för karcinom, aktiveras β -katenin signalering generellt av onkogen mutationer i APC-genen, som kontrollerar stabiliteten av β -katenin (Farrall et al., 2012).

APC-genen är en tumörsuppressorgen som är lokaliserad på femte kromosomen. Mutationer i APC-genen orsakar FAP men spelar även en roll vid majoriteten av sporadisk KRC. FAP-patienter utvecklar hundratals till tusentals kolorektala adenom som är benigna prekursorer till KRC (Morin et al., 2016). Aktiveringen av Wnt-signaleringsräckan betraktas som den initierande händelsen i KRC och är förknippat med funktionsförlust av APC (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018). Den vanligaste mutationen i KRC är inaktivering av APC. Över 90 % av alla KRC-fall har inaktiverande mutationer i APC-genen, vilket ökar Wnt-signaleringsräckan (Langlands et al., 2018). Mutationer i APC kan vara ärftliga (FAP) eller uppstå sporadiskt i de somatiska cellerna. I sporadisk KRC krävs det att båda allelerna av APC-genen inaktiveras (Markowitz & Bertagnolli, 2009). Detta leder till heterozygotförlust av APC-genen hos FAP-patienter. Förlust av APC-genfunktionen utlöser kaskader av händelser som så småningom leder till malign transformation i tjocktarmen. Den huvudsakliga tumörundertryckande funktionen hos APC ligger i dess kapacitet att korrekt reglera intracellulärt β -katenin (Fodde, 2002). Förutom APC-genen kan även andra komponenter i Wnt-signaleringsräckan orsaka cancer. Funktionsförlustmutationer i Axin har påträffats i hepatocellulär karcinom som orsakar cancer i levercellerna, medan onkogena mutationer i β -katenin har kopplats till KRC, melanom samt olika fasta tumörer såsom hudtumörer i talgkörtlar (eng. sebaceous carcinoma) (Reya & Clevers, 2005; Clevers & Nusse, 2012). Slutligen har överuttryck av Lgr5 kopplats till tjocktarmscancer (Carmon et al., 2012).

2.8 APC^{Min/+}-mus som modellorganism

Musen har blivit den mest populära däggdjursmodellen tack vare musens genetiska likhet till människan, möjligheterna att genetiskt manipulera musens genom och tillgängligheten till många mutanter och inavlade stammar (Vanhooren et al., 2013). Inavlade möss används ofta inom forskning. Fördelarna med dessa stammar är väldefinierade genomer, stabila fenotyper och omfattande data som är fritt tillgängligt till exempel från publicerade studier. Den vanligaste inavlade stammen är troligen C57BL / 6J, som innehåller flera kända allelvarianter som påverkar fenotypen (Köks et al., 2016).

Multipel tarmneoplasia (eng. multiple intestinal neoplasia, Min) är en punktmutation i den murina homologen av APC-genen. Mutanta allelen (Min) av det murina APC lokuset kodar för en nonsensmutation vid kodon 850. APC^{Min/+} är en autosomal dominerande allel som kännetecknas av utveckling av flera tarmtumörer och anemi (Nalbantoglu et al., 2016). APC^{Min/+}-möss (C57BL/6J-Apc^{Min/+}) är predisponerade för tarmadenombildning, liksom människor som har mutationer i APC-genen (Moser et al., 1993). Antalet adenom som bildas kan skilja mellan musstammar. Tarmtumörer från APC^{Min/+}-möss visar omfattande förlust av vildtypsallelen vid APC (Moser et al., 1995). Apc^{Min/+}-möss används som modellorganismer för att studera genetiska, miljömässiga och terapeutiska aspekter av tarmneoplasia hos människor. Musstammen APC^{Min/+} har använts bland annat inom forskning av FAP (Dazard et al., 2014).

Apc^{Min/+}-möss i den C57BL/6J genetiska bakgrunden utvecklar mer än 50 tumörer vid 90 dagars ålder, mestadels i hela tunntarmen. Även om tumörerna sällan blir invasiva orsakar tumörerna att mössen dör senare av tarmobstruktion och anemi på grund av blödning från de större polyperna. Apc^{Min/+}-möss delar många genetiska och fenotypiska likheter med människor med FAP. Adenom utvecklas både hos människor och möss som ett resultat av kromosomal instabilitet initierad genom inaktivering av APC-genen. Ortologa gener från mus och människa är ungefär 90 % identiska men tjocktarmstumörer är vanligare och har mycket större potential för malignitet hos människor, medan tumörer i tunntarmen är vanligare hos möss. Till skillnad från den mänskliga fenotypen observeras sällan bindvävstumörer (eng. desmoid tumors) och epidermoidcystor i musmodeller (Nalbantoglu et al., 2016).

2.8.1 Organoider

Utvecklingen av tarmorganoider har skapat nya möjligheter för att studera tarmfunktioner samt cellulära processer. En organoid definieras som ett miniatyrorgan som odlas in vitro. Det kan produceras via multipotenta stamceller som odlas i stromasättande ämne såsom Matrigel. Organoider skapas genom att cellerna organiseras till organliknande strukturer som påminner om den riktiga tarmmiljön. Tarmorganoider är självförnyande tredimensionella strukturer som består av intestinala stamceller samt deras differentierade epitelceller. Den tredimensionella strukturen möjliggör en robust forskning av cellaktiviteten, strukturen,

cellorganisationen samt möjliggör genetisk manipulation och effektivare tarmrespons från stimuli jämfört med den traditionella tvådimensionella cellkulturen. Vävnad som plockas från tunntarmen och upprätthåller tunntarmsfunktion och struktur kallas för en enteroid (Wallach & Bayrer, 2017).

$Apc^{Min/+}$ -möss har använts i stor utsträckning för att studera tidiga stadier av cancer. Organoider som härstammar från $Apc^{Min/+}$ -möss genomgår tidiga stadier av tarmpolypos i organoidkulturer. Organoiderna upprätthåller initialt en normal krypt-villus-arkitektur, men växer så småningom som sfäriska cyster (sfäroider) som återspeglar den selektiva tillväxtfördelen för celler som har förlorat APC-genens heterogenitet ($Apc^{Min/+}$). Mutationer i APC leder till en uppreglerad Wnt-signalering i polyper i $Apc^{Min/+}$ -möss. Det samma gäller även i organoider. Celler i dessa sfäriska $Apc^{Min/Min}$ -organoider har en hyperaktiv Wnt-signalering på grund av ackumulering av nukleär β -katenin (Langlands et al., 2018).

Det har påvisats att antalet differentierade celler i tarmen är färre i homozygot $Apc^{Min/Min}$ -vävnad. Uttrycket av differentierade cellmarkörer minskade i $Apc^{Min/Min}$ -men inte i $Apc^{Min/+}$ -möss. Inaktivering av APC leder till ackumulering av β -katenin i kärnan, vilket orsakar en grov förändring av transkriptomet och en serie av cellförändringar, till exempel cellernas förmåga att migrera samt differentieras (Sansom et al., 2004).

2.9 Adeno-associerat virus (AAV)

Virus är intracellulära parasiter av levande men icke-cellulär natur sammansatta av DNA eller RNA och en proteinbeläggning (eng. protein coat). Eftersom de endast kan replikeras i levande värdceller är infektion ett väsentligt steg i deras livscykel. Därmed har virus blivit ett mycket utvecklat verktyg specialiserade på infektion och överföring av genetiskt material till celler från andra organismer (Cotter & Muruve, 2005). Adeno-associerat virus (AAV) är en viral vektor som används inom biomedicinsk forskning och genterapi. Virala vektorer är verktyg som används för att leverera genetiskt material till celler. AAV-vektorer är exempel på verktyg som används för att leverera DNA till målceller och studera genfunktion in vivo. AAV-vektorer har flera fördelar, inklusive förmågan att packa in stora mängder DNA, lätt att producera och

bred celltropism. AAV-genom kan existera stabilt i ett episomalt tillstånd med en låg hastighet av genomisk integration, vilket minskar risken för infogande av mutationer. Vildtyp AAV tillhör parvovirusfamiljen och består av en 4,7 kb enkelsträngad DNA inkapslad i en kapsid utan hölje (eng. non-enveloped capsid). Det finns höga förväntningar för användningen av AAV som genterapivektor för prekliniska och kliniska tillämpningar. Förmågan att använda detta verktyg hindras emellertid av att virusen i sig inte är lättillgängliga. Dock har många metoder utvecklats för AAV-produktion (Chen et al., 2018). Även om mycket återstår att göra, både för att studera den grundläggande biologin av AAV och för att optimera dess kliniska tillämpning, hör AAV-vektorer för tillfället till de säkraste och mest effektiva metoder för genöverföring i däggdjursceller (Salganik et al., 2014).

3 Målsättningar

Tjocktarmscancer utgör nästan 9 % av alla cancerfall och är bland de vanligaste cancerformerna i världen (Ghoncheh et al., 2016). Det har påvisats att över 90 % av alla tjocktarmscancerformer har mutationer i tumorsuppressorgen APC (Langlands et al., 2018). Påverkan av GDNF-RET-signalering är inte fullständigt klargjord i tjocktarmscancer. Opublicerat data från Ollilas forskningsgrupp har påvisat att GDNF-RET-signalering påverkar proliferationen av vildtypsorganoider odlade från murina tunntarmsepitelceller. Dessutom har opublicerat data från Ollilas forskningsgrupp påvisat att RET uttrycks i en del av tarmens stamceller som ligger bredvid myofibroblasterna som uttrycker GDNF. Detta ställde hypotesen att RET ligander samt GDNF-RET-signalering kan spela en roll i tjocktarmscancer. Det är oklart hur GDNF-RET-signaleringen påverkar proliferationen av epitelet när APC-genen är muterad. Därmed var det huvudsakliga målet med detta pro gradu-projekt att undersöka om rekombinant GDNF eller RET-hämmare har en påverkan på APC-muterat tarmepitelets proliferation.

Eftersom möss utvecklar tumörer i tunntarmen till skillnad från människan som utvecklar tumörer i tjocktarmen, isolerades tumörer som användes som utgångsmaterial för experimenten från mössens tunntarm. Båda allelerna av APC-genen är alltid inaktiverade i sporadisk tjocktarmscancer. På grund av detta var målet att etablera en organoidkultur av APC^{Min/+}-mössens tunntarmceller och därefter försöka odla endast mutanta organoider, som kallas för sfäroider, med homozygota alleler av den muterade APC-genen (APC^{Min/Min}). APC^{Min/Min}-organoider möjliggör att i en 3D-modell undersöka tidig tumörutveckling. Eftersom studier har påvisat att antalet differentierade celler i tarmen är mindre hos homozygota Apc^{Min/Min}-möss (Sansom et al., 2004), var ett annat mål att undersöka hur GDNF-RET-signalering påverkar uttrycket av differentierade epitelceller i APC^{Min/Min}-organoider.

Ett ytterligare mål var att utveckla en fungerande metod för att transducera GDNF-överuttryckande plasmid till möss med hjälp av Adeno-associerat virus (AAV). Detta skulle tillåta studier om hur GDNF uttrycks samt lokaliseras i tarmen. Denna metod utvecklas för tillfället i Ollilas forskningsgrupp och mitt mål var att undersöka den bästa serotypen av Adeno-associerat virus (AAV) för experimentet genom att jämföra

olika serotypers effektivitet och lokalisering av AAV-medierad transduktion av GFP till tunntarmen samt tjocktarmen.

Specifika ändamål för detta pro gradu-projekt var att:

1. Undersöka hur uttrycket av GDNF-familjeligander och receptorer samt Wnt-signaleringsmarkörer förändras i APC^{min}-muterat tarmepitel.
2. Etablera APC^{Min/Min}-organoidkultur.
3. Undersöka hur GDNF-RET-signaleringsmarkörer påverkar proliferationen av APC^{min}-organoider.
4. Undersöka hur GDNF-RET-signaleringsmarkörer påverkar uttrycket av differentierade epitelceller och Wnt-signaleringsmarkörer i APC^{min}-organoider.
5. Undersöka effektiviteten och lokaliseringen av AAV-medierad genöverföring av GFP till mustarmen.

4 Material och metoder

4.1 Genotypbestämning av transgena APC^{Min/+}-möss

För att isolera DNA från mössens öronbitar användes MyTag™ Extract-PCR kit (Bioline, London, Storbritannien). Till röret med vävnadsbiten tillsattes buffert A, buffert B och vatten. Lösningen blandades och inkuberades sedan i 10 minuter vid 75 °C samt därefter i 10 minuter vid 95 °C. För polymeraskedjereaktionen (PCR) användes det 1 µl av supernatanten från DNA-extraheringen. En reaktionsblandning blandades av 100 µM framåtprimer, 100 µM bakåtprimer, MyTaq HS Red Mix, och destillerat vatten. För att detektera APC^{Min/+}-genen användes framåtprimern 5' - TGAGAAAGACAGAAGTTA- 3' (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) och som bakåtprimer användes 5' -TTCCACTTTGGCATAAGGC- 3' (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Storleken på produkten är 327 baspar. Reaktionsblandningen pipetterades till PCR-remsor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) och DNA-templatet blandades därefter med reaktionsblandningen. Ett negativt kontrollsample kördes samtidigt i vilket det tillsattes vatten istället för DNA. Efter att PCR-reaktionen hade blandats, ställdes proven i en PCR-maskin (Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) och PCR-programmet påbörjades (Tabell 1).

Tabell 1. PCR-programmet

Steg	Temperatur	Tid	Uppprepningar
Denaturering	95 °C	3 minuter	-
Denaturering	95 °C	15 sekunder	35
Bindning	52 °C	15 sekunder	
Elongering	72 °C	20 sekunder	
Förvaring	4 °C	∞	-

PCR-proven separerades sedan i en 1 % agarosgel (se bilaga 2) för att detektera de amplifierade DNA-sekvenserna från PCR-reaktionen. Agarosgelen innehöll etidiumbromid som binder till nukleinsyror och används som en fluorescerande sond. Tillsammans med proven separerades en markör för att kunna bestämma DNA-molekylernas molekylvikt (GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Elektrofores är en metod som separerar

molekyler enligt deras molekylvikt. DNA separerades med hjälp av elektrisk spänning vid 100 V för en timme. DNA kommer att vandra mot den positiva polen eftersom DNA är negativt laddat. Efter elektroforesen visualiserades resultaten genom att placera agarosgelen under UV-ljus i NuGenius-maskinen (Syngene, Bangalore, Indien).

4.2 Tunntarm-organoidkultur

Organoidkultur efterliknar tarmens struktur in vitro och används som modeller för bland annat tarmutveckling samt sjukdomar. Metoden går ut på att isolera stamceller från tarmens kryptor och odla dessa i kultur till tredimensionella vävnadskulturer, det vill säga organoider (figur 7). Organoider odlades från tunntarmens kryptceller som isolerades från möss och placerades i matrix. Media med de olika komponenterna pipetterades på matrixet.

I detta pro gradu-projekt skapades organoidkulturer för att bedöma hur rekombinant GDNF och RET-hämmare påverkar proliferationen av APC^{min}-organoidkulturer. Faktorer såsom initiering, storlek, proliferation och differentiering analyserades. Storleken av organoiderna analyserades med ljusmikroskop (EVOS XL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2.1 Isolering av tunntarmens kryptceller

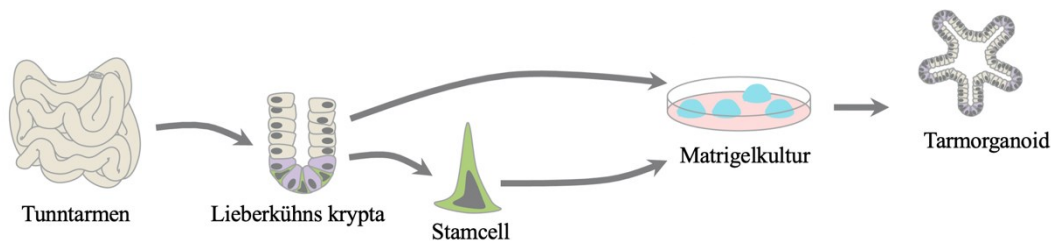
Tunntarmen isolerades ur vildtypsmöss eller APC^{Min/+}-möss (C57BL/6J-ApcMin/J, Jackson Laboratory) och tarmkär avlägsnades från tarmen. Alla möss var över 16 veckor gamla. Därefter sköljdes tarmen med kall kalcium- och magnesiumfri fosfatbuffrad saltlösning (KMF-PBS) (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, 1 X utan kalcium och magnesium, Corning, NY, USA) (pH 7–7,6) varefter tarmen öppnades longitudinellt genom att riva den sönder med hjälp av ett sondmatningsrör (eng. gavage needle). Tarmen placerades på en cellodlingsskål med kall KMF-PBS och tvättades tre gånger för att avlägsna slem. Efter att slemmet avlägsnats snittades tunntarmen till 3 mm långa fragment. Fragmenten överfördes till ett rör och tvättades en sista gång med KMF-PBS genom att skaka försiktigt i några sekunder, varefter supernatanten hälldes bort. KMF-PBS med 10 mM etylendiamintetraättiksyra

(EDTA) (PBS-EDTA) tillsattes till fragmenten och placerades horisontellt på is. Till näst inkuberades tarmfragmenten i PBS-EDTA och efter 15 minuter skakades fragmenten i 10 sekunder varpå supernatanten hälldes bort. Detta steg upprepades ytterligare 2 gånger. EDTA dissocierar kryptor samt villi kemiskt från tarmen. Till näst tillsattes ny PBS-EDTA till fragmenten och inkuberades horisontellt i 60 minuter på is. Efter att fragmenten hade inkuberats i 105 minuter i PBS-EDTA skadades fragmenten i 15 sekunder och filtrerades därefter genom en 70 µm filter (eng. 70µm Cell strainer, Corning, NY, USA). Därefter placerades fragmenten från filtret tillbaka till röret och tillsättning av PBS-EDTA samt skakande upprepades 2–3 gånger för att nå tillräckligt av krypt-innehållande PBS-EDTA buffert. Kryptorna centrifugerades i 2 minuter vid 200 x g, varefter pelleten suspenderades med KMF-PBS.

4.2.2 Odling av kryptceller i matrix

Efter att kryptpelleten suspenderats med KMF-PBS, centrifugerades kryptorna än en gång i 2 minuter vid 200 x g. Därefter suspenderades pelleten med kryptmedia (se bilaga 2) för att nå den önskade koncentrationen i cellsuspensionen (ca. 300 kryptor per brunn). Koncentrationen justerades genom att ta cellsuspension och blanda det i förhållandet 1:3 med kryptmedia, som motsvarar förhållandet i brunnarna med cellsuspension och matrigel. Därefter räknades kryptorna för hand och kryptmedia tillsattes vid behov till cellsuspensionen för att nå den önskade koncentrationen. Livsdugligheten (eng. viability) av kryptorna bestämdes under ett ljusmikroskop genom att utspäda 1:1 cellsuspension med 0,4 % trypan blå (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). För organoidkultur odlades kryptorna i små kupoler (24 µl) innehållande 75 % matrigel (Corning, NY, USA) och 25 % cellsuspension. Matrigel påminner om den extracellulära miljön som finns i olika vävnader och används för odling av celler. Kupolerna stelnades i 15 minuter vid 37 °C. Kupolerna täcktes därefter med kryptmedia. De två första dagarna odlades organoiderna i kryptmedia som innehåller 10 µM av tillväxtfaktorn Y-compound. Y-compound är en hämmare för Rho-kinaser. Median byttes därefter till ENR-media (se bilaga 2) som saknar Y-compound. ENR kommer från tillväxtfaktorerna EGF, n-acetylcystein, noggin och R-spondin som median innehåller. Tillväxtfaktorerna är väsentliga för organoidernas proliferation. Organoiderna odlades i en inkubator vid 37 °C med 5 % koldioxid och en vattenmättad atmosfär. Organoidernas medium byttes var tredje dag och delades vid behov var

fjärde eller femte dag. Organoiderna delades genom att ta bort mediumet och söndra organoiderna till enstaka kryptor. Därefter suspenderades kryptorna med KMF-PBS och centrifugerades i 5 minuter vid 300 x g. Sedan suspenderades kryptpelletten med kryptmedia och kryptorna odlades i nya kupoler. Till organoidkultur tillsattes 100ng/ml av GDNF och Gfra1 för att öka GDNF-RET-signalerings och till organoidkultur var GDNF-RET-signalerings hämmades, tillsattes 1µM av Pz-1 som är en RET-hämmare. Organoiderna lossades från matrigel genom att centrifugera i 5 minuter vid 300 x g med KMF-PBS och därefter aspirera bort vätskan.



Figur 7. Schematisk bild av organoidkultur. Tunntarmen isoleras ur en mus och kryptceller dissocieras kemiskt från tarmen. De isolerade cellerna odlas i matrigel som efterliknar extracellulära miljön i diverse vävnader. Kryptorna innehåller stamceller som bildar tarmorganoider i matrigelkulturen. Figuren modifierad från Kretschmar & Clevers, 2016.

4.2.3 APC^{Min}-organoider

APC^{Min/+}-organoiderna odlades enligt två skilda strategier. Den första strategin gick ut på att odla de två första dagarna med kryptmedia och därefter byta till EN-media som saknar R-spondin (se bilaga 2). R-spondin är en Wnt-aktiverare som främjar proliferationen av organoiderna. Den andra strategin bestod av att odla organoiderna de två första dagarna med kryptmedia och byta därefter till ENR-media. Organoiderna odlades i 34 dagar i ENR-media och odlades därefter i EN-media för att nå R-spondin-oberoende proliferation av organoider. Organoiderna delades cirka var fjärde dag. Målet var att odla endast mutanta homozygota APC^{Min/Min}-organoider, det vill säga sfäroider som har hyperaktiv Wnt-signalerings. Heterozygota APC^{Min/+}-organoider borde inte överleva behandlingen, eftersom de behöver R-spondin för deras proliferation.

4.3 RNA-extraktion och mätning av genuttrycksnivåer med hjälp av RT-qPCR-metoden

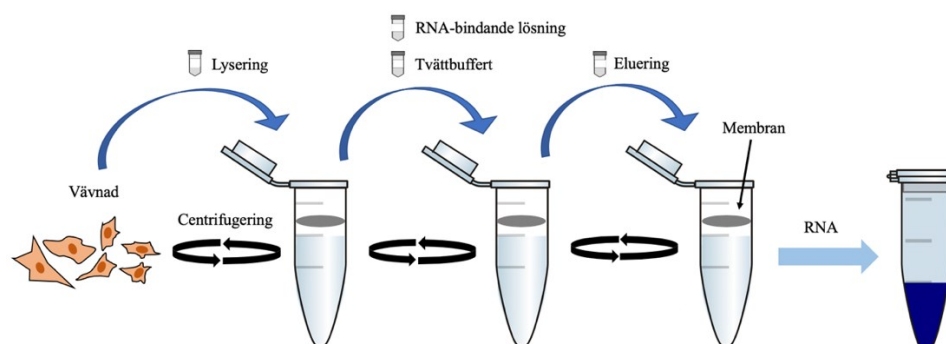
RNA-extraktion utfördes för att isolera RNA från organoider samt musvävnad (vävnad från hela tunntarmen). RNA extraherades med utrustningen Nucleospin® RNA plus (Macherey-Nagel, Düren, Tyskland) från mössens tumörvävnad och utrustningen Qiagen RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) användes för organoiderna. Därefter syntetiserades cDNA från de extraherade RNA. RNA-extraktion utfördes för att separera RNA från cell- samt vävnadsprov. Proven lyserades först i en kaotropisk buffertlösning, vilket inaktiverar ribonukleaser och förhindrar nedbrytning av RNA. DNA avlägsnades från lysaten varefter bindande lösning tillsattes till lysatet för att binda RNA-molekylerna på membranet. Därefter tvättades RNA, vilket avlägsnar salter samt makromolekylära cellkomponenter. Till slut eluerades RNA med RNas-fritt vatten (figur 8).

4.3.1 RNA-extraktion av tunntarmens tumörvävnad och kontrollvävnad bredvid tumörerna

RNA-extraheringen påbörjades med att lysera och homogenisera samplet i lysisbuffert vilket inaktiverar ribonukleaser. Därefter överfördes det homogeniserade lysatet till en NucleoSpin® kolumn och filtrerades genom att centrifugera i 30 sekunder vid 11 000 x g. Under centrifugering binds DNA till ett filter, varefter det tillsattes RNA-bindande lösning till vätskan. Lysatet suspenderades och överfördes till en NucleoSpin® RNA plus kolumn, varpå lysatet centrifugerades i 15 sekunder vid 11 000 x g. Provet på membranet i kolumnen tvättades med tvättbuffert 1 och centrifugerades i 15 sekunder vid 11 000 x g. Sedan tillsattes två gånger tvättbuffert 2 till kolumnen och centrifugerades mellan varje tvätt i 15 sekunder vid 11 000 x g. Tvättbuffert 1 och 2 avlägsnar biomolekyler samt salter ur provet. Membranet torkades genom att centrifugera i 2 minuter vid 11 000 x g. För att nå en högre RNA-koncentration eluerades membranet två gånger med samma RNas-fria vattnet. Samplet centrifugerades efter varje tillägg av RNas-fritt vatten i 1 minut vid 11 000 x g. RNA-koncentrationen (ng/μl) mättes av proven med NanoDrop1000-spektrofotometern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA-proven förvarades i -20 °C.

4.3.2 RNA-extraktion av organoider

Extraheringen av RNA från organoiderna påbörjades genom att homogenisera RLT-lysisbuffert med organoidpelleten genom att blanda den i 30 sekunder. Efter homogeniseringen tillsattes 70 % etanol till lysatet. Etanolets uppgift är att främja bindningen av RNA till ett silicamembran som används i nästa steg. Därefter överfördes lysatet till ett silicamembran-innehållande RNEasy MinElute spin-kolumn och centrifugerades i 15 sekunder vid 8000 x g. RNA från lysatet fastnar i silicamembran-filtret i kolumnen medan resten av vätskan filtreras igenom. Vätskan kastades bort och RW1-buffert tillsattes till kolumnen och centrifugerades i 15 sekunder vid 8000 x g. Till näst tillsattes DNAs-innehållande RDD-buffert på filtret i kolumnen och inkuberades i 15 minuter vid rumstemperatur. RNas-fritt DNAs möjliggör effektiv spjälkning av genomiskt DNA. Därefter tillsattes RW1-buffert till kolumnen och kolumnen centrifugerades i 15 sekunder vid 8000 x g. RW1 tvättar provet och avlägsnar biomolekyler som till exempel proteiner. Kolumnen överfördes till ett nytt uppsamlingsrör och RPE-buffert tillsattes till kolumnen, varefter det centrifugerades i 15 sekunder vid 8000 x g. RPE -buffert avlägsnar salter från provet. Efter centrifugering tillsattes 80 % etanol och centrifugerades i 2 minuter vid 8000 x g. Därefter centrifugerades provet ytterligare för att torka membranet i 5 minuter vid 20 000 x g. Sedan eluerades RNA i RNas-fritt vatten och centrifugerades i 1 minut vid 20 000 x g. Till slut mättes RNA-koncentrationen med NanoDrop1000-spektrofotometern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA-proven förvarades i -20 °C.



Figur 8. Schematisk figur över RNA-extrahering. Cell- eller vävnadsmaterial lyseras och homogeniseras med hjälp av lysisbuffert. RNA fastnar i membran som finns i röret. Provet tvättas av biomolekyler samt salter. Mellan varje steg centrifugeras proven. Slutligen elueras all RNA från membranet med RNas-fritt vatten.

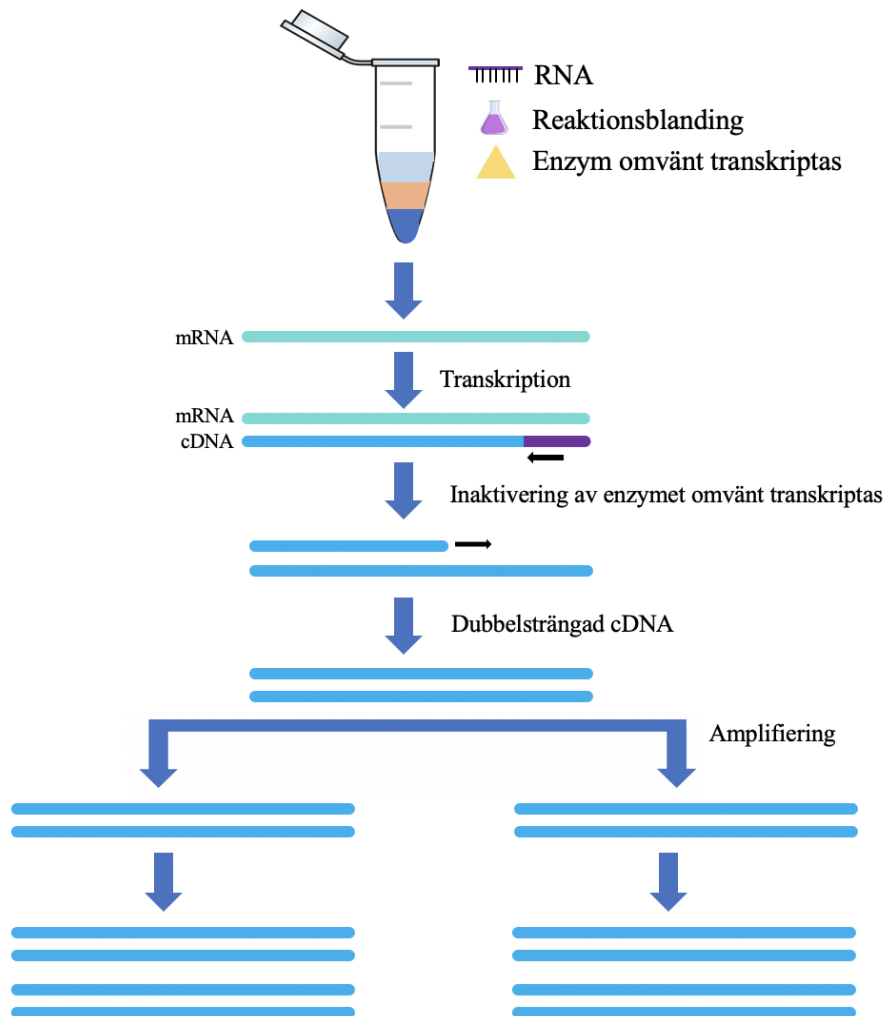
4.3.3 Mätning av genuttrycksnivåer med hjälp av RT-qPCR-metoden

Kvantitativ omvänd transkriptions-PCR (eng. quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) används när utgångsmaterialet är RNA. Under metoden transkriberas RNA först till komplementärt DNA (eng. complimentary DNA, cDNA) med hjälp av enzymet omvänt transkriptas från budbärar-RNA (eng. messenger RNA, mRNA). Komplementärt DNA används sedan som material för RT-qPCR.

Målgener för GDNF-RET-signaleringsräckan är RET samt de neurotrofiska faktorerna GDNF, NRTN, ARTN och PSPN och receptorerna Gfra1, 2, 3 och 4. För att mäta aktiviteten av GDNF-RET-signaleringsräckan i realtid, mättes mRNA-uttrycket av RET, GDNF, NRTN, ARTN, PSPN, Gfra1, Gfra 2, Gfra 3 och Gfra 4-generna med hjälp av RT-qPCR. Därtill mättes genuttrycket av enteroendokrina celler med hjälp av generna kromogranin A (eng. Chromogranin A, ChgA), Neurotensin (Nts), och Tac1. ChgA och Tac1 uttrycks i enterokromaffina celler medan Nts uttrycks i N-celler. Med hjälp av genen Lyz1 som kodar för panetcell-specifika lysozymer, mättes genuttrycket av panethceller (Zhong et al., 2015). Genuttrycket av stamceller mättes med hjälp av markörerna för genen Olfr4 och Lgr5-positiva stamceller mättes med Lgr5-genen. För att mäta aktiviteten av Wnt-signaleringsvägen mättes mRNA-uttrycket av Axin2 och Wnt-målgenen Prox1. Lgr5 är även en Wnt-målgen, eftersom Lgr5 bildar ligander med R-spondin proteiner, som främjar kanonisk Wnt-signaleringsvägen (Cramer et al., 2015). β -aktin användes som hushållsgen i dessa experiment. I detta pro gradu-projekt utfördes RT-qPCR på celler som härstammade från musvävnad. Genuttrycket av GFL:er och GFR:er analyserades för att jämföra normal vävnad och APCmin-muterat tunntarmsvävnad (tumörer). Dessutom utfördes RT-qPCR på tunntarm-organoider för att mäta genuttrycket av GFL:er och GFR:er.

Metoden påbörjas med PCR med omvänd transkription (eng. reverse transcription PCR, RT-PCR). Med hjälp av RNA-koncentrationerna utspäddes varje RNA-prov så att alla proven innehöll totalt 5–10 ng RNA. Proven pipetterades till PCR-remsor och värmdes upp genom att inkubera vid 70°C i 3 minuter, varefter proven placerades på is. En reaktionsblandning blandades av TaqMan™ Reverse Transcription reagententerna (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Till blandningen tillsattes: DNA polymeras PCR buffert (10x), magnesiumklorid (MgCl₂),

deoxiribonukleotidtrifosfater (dNTP:er), slumpmässiga primrar (eng. random primers) och RNas-hämmare. Lösningen delades till två tuber, en för RNA-proven och en för negativ kontroll. Den negativa kontrollen (noRT) fungerar som en kontroll för omvända transkriptionen. Detta betyder att i provet borde det inte ske transkription av RNA till cDNA, vilket används för att försäkra att ingen kontamination av genomiskt DNA finns i det extraherade RNA. Till rören för RNA-proven tillsattes MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) och till rören för negativa kontrollen tillsattes vatten. MultiScribe™ Reverse Transcriptase är ett rekombinant musleukemivirus (eng. recombinant moloney murine leukemia virus, rMoMuLV) som fungerar som ett omvänt transkriptas under PCR-reaktionen. Enzymet omvänt transkriptas skapar med hjälp av slumpmässiga primrar en enkelsträngad cDNA-kopia från RNA-templatet (Rio, 2014). Till RNA-proven tillsattes lösningen med enzymet omvänt transkriptas och till negativa kontrollen tillsattes lösningen med vatten. Därefter inkuberades proven vid 25°C i 10 minuter, vid 48°C i 30 minuter och vid 95°C i 5 minuter. Under RT-PCR reaktionen sker det först transkription av mRNA-templatet till cDNA med enzymet omvänt transkriptas (figur 9). Därefter inaktiveras enzymet och den resulterande enkelsträngade cDNA:et används som templat för RT-PCR-reaktionen. Slutprodukten blir dubbelsträngat DNA som amplifieras med hjälp av DNA polymeras. Det färdiga cDNA:et utspäddes 1:1 med vatten.



Figur 9. Principen för PCR med omvänt transkription. En reaktionsblandning blandas av TaqMan™ Reverse Transcription reagenterna. RNA och enzymet omvänt transkriptas blandas med reaktionsblandningen. Under PCR med omvänt transkription (eng. reverse transcription PCR, RT-PCR) omskrivs RNA till komplementärt DNA (eng. complimentary DNA, cDNA). Ett cDNA-templat transkriberas från mRNA-templatet, vilket fungerar som en modell vid amplifieringen av cDNA. Enzymet omvänts transkriptas inaktiveras och slutprodukten blir dubbelsträngat DNA.

Efter att mRNA hade omvandlats till cDNA, mättes mängden cDNA i varje prov med hjälp av SYBR Green. SYBR Green är ett grönt fluorescerande cyaninfärgämne som har hög affinitet för dubbelsträngat DNA. Två skilda lösningar blandades. Till den första lösningen pipetterades 5 ng/μl cDNA och en färdig reaktionsblandning KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Till den andra lösningen tillsattes destillerat vatten och en blandning av framåt- samt bakåtprimrarna med koncentrationen av 2 μM av båda primrarna. Primersekvenserna för generna som undersöktes framställs i tabellen nedan (tabell 2). Till brunnarna i en

96-hålsplatta (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pipetterades cDNA-reaktionsblandningen och primer-blandningen. En ytterligare negativ kontroll användes för att försäkra att det inte skett kontaminationer. Den negativa kontrollen innehöll primrarna, reaktionsblandningen KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix och destillerat vatten. Proverna pipetterades i duplikat i en 96-hålsplattan. Plattan överströks därefter med plast (Q-Stick™ qPCR seal, 4titude, Wotton, Storbritannien) och centrifugerades. Proven analyserades med apparaten StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Programmet för RT-qPCR-proven var följande: 20 sekunder i 95 °C, 3 sekunder i 95 °C, 30 sekunder i 60 °C, 15 sekunder i 95 °C, 1 minut i 60 °C och 15 sekunder i 95 °C. Cykeln upprepades 40 gånger. Resultaten analyserades i programmen Excel och GraphPad Prism 8.

Tabell 2. Framåt och bakåt primrarna som användes i RT-qPCR.

Gen	Framåtprimer	Bakåtprimer
Artemin	5' -GACCAGGACCCCTTTGGTA- 3'	5' -TGTCTTCTAAGACCCTTCTGCTC- 3'
Axin2	5' -GCTCCAGAAGATCACAAAGAGC- 3'	5' -AGCTTTGAGCCTTCAGCATC- 3'
Beta-aktin	5' -CTAAGGCCAACCGTAAAAAG- 3'	5' -ACCAGAGGCATACAGGGACA- 3'
ChgA	5' -TCCCCACTGCAGCATCCAGTTC- 3'	5' -CCTTCAGACGGCAGAGCTTCGG- 3'
Gdnf	5' -CGCTGACCAGTGACTCCAATATGC- 3'	5' -TGCCGCTTGTTTATCTGGTGACC- 3'
Gfra1	5' -TGTCTTAAGGAGAACTACGCAGAC- 3'	5' -TGAGGCTGCTGGAGTCTATG- 3'
Gfra2	5' -AGTGTCATCACCACCTGCAC- 3'	5' -GAAACACATGCTTAACCTTTGGA- 3'
Gfra3	5' -TGATCCTGCTACTGGTGCTG- 3'	5' -CTCTGTGGCAAGGGAGTTTC- 3'
Gfra4	5' -TCTTTACAAGGAACCCCTGCT- 3'	5' -GAAACAGCACCCAGCAGTCT- 3'
Lgr5	5' -TAAAGACGACGGCAACAGTG- 3'	5' -GCCTTCAGGTCTTCCTCAAA- 3'
Lyz1	5' -GGCAAAACCCCAAGATCTAA- 3'	5' -TCTCTCACCACCCTCTTTGC- 3'
Neurturin	5' -GGAGGAGTCACCACTGACCG- 3'	5' -TAGCAGGGAGCTGCAGATGA- 3'
Nts	5' -TGCTGACCATCTTCCAGTCC- 3'	5' -GAATGTAGGGCCTTCTGGGT- 3'
Olfm4	5' -CAGCTGCCTGGTTGCCTCCG- 3'	5' -GGCAGGTCCCATGGCTGTCC- 3'
Persefin	5' -AGAGACTAGAGGGACCTGGAC- 3'	5' -GCTCCACAGTCGGCATGAAC- 3'
Prox1	5' -GCTATACCGAGCCCTCAACA- 3'	5' -ATCCAGCTTGAGATGACCT- 3'
Ret	5' -TCCCTTCCACATGGATTGA- 3'	5' -ATCGGCTCTCGTGAGTGGTA- 3'
Tac1	5' -CGAGGGGGCGGCTAATTAATA- 3'	5' -AGCTCCTGCTTGCGGTATT- 3'

4.5 Immunofluorescens

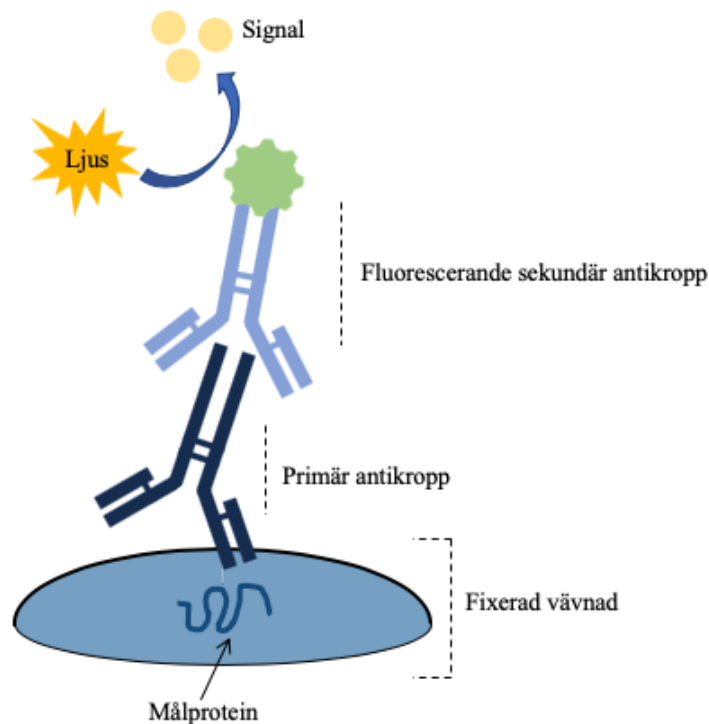
Immunofluorescens utnyttjas ofta för att observera förändringar i patofysiologiska vävnadsprov. Tekniken tillåter visualisering av markörmolekyler på celler och i deras miljö (Mori & Cardiff, 2016). Önskade markörproteiner lokaliseras genom fluorescerande antikroppar som binder till specifika antigener i cellerna (figur 10). Metoden används inom forskning för att diagnostisera t.ex. cancer (Ramos-Vara, 2005). Metoden går ut på att vävnadsproven efter fixering inkuberas i en permeabiliserande substans, vilket tillåter antikropparna att nå cellernas insida och binda till målantigenen. Därefter inkuberas vävnaden i önskad antikropp och

märkämne för att visualisera proteinerna. I denna studie utfördes immunofärgning på mustarmar för att undersöka effektiviteten och lokaliseringen av AAV-GFP medierad transduktion (intraperitoneal) av mössens tunn- och tjocktarm. Tarmarna färgades med anti-GFP och med anti- β III tubulin (β 3T) som är en hushållsgen i neuroner. Som sekundära antikroppar användes konjugerade antikroppar med Alexa 488 och 594 (tabell 3). Transduktion av AAV till mössen samt paraffininbäddning av tarmarna var tidigare gjort i Saara Ollilas laboratorium.

4.5.1 Immunofärgning av mustarmar

I denna studie utfördes immunofärgning på färdigt preparerade paraffininbäddade mustarmar. Deparaffinering av tarmarna skedde genom att bada objektglasen i en etanolserie: xylen, 100 % etanol, 94 % etanol och 70 % etanol. Objektglasen badades i xylen fyra gånger (5, 5, 3 och 3 minuter), i 100 % etanol tre gånger (2, 2 och 2 minuter), i 94 % etanol två gånger (2 och 2 minuter) och en gång i 70 % etanol i två minuter. Efter deparaffineringen återhämtades antigenerna (eng. antigen retrieval, AR) genom att inkubera tarmarna i antigen återvinninglösning med pH 9 (Target Retrieval Solution, pH9, Agilent, Santa Clara, CA, USA) i 25 minuter vid 95 °C. Vävnader som har bevarats med paraffininbäddning innehåller en mängd kemiska modifikationer som kan minska proteinernas detektion i immunohistokemiska experiment. Antigenåtervinning minskar eller eliminerar dessa kemiska modifieringar. Därefter inkuberades tarmarna ytterligare 30 minuter vid rumstemperatur. Tarmarna tvättades sedan två gånger med 1 x trisbuffrad saltlösning (eng. tris-buffered saline, TBS) (pH 7.6). Tarmarna permeabiliserades sedan med 0,1 % Triton-X utlöst i 1 x TBS i 10 minuter vid rumstemperatur, varefter de tvättades två gånger med 1 x TBS. En cirkel ritades runt tarmarna med en vattenavvisande PAP-penna (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) som håller färgningsreagenserna på tarmarna samt förhindrar blandning av andra reagenser på tarmarna på samma objektglas. Tarmarna inkuberades därefter i 5 % getserum (eng. normal goat serum, NGS) upplöst i 1 x TBS i 30 minuter vid rumstemperatur. Genom att inkubera tarmarna i serum förhindras antikropparnas ospecifika bindning. Därefter inkuberades tarmarna i primära antikroppen under en natt vid 4 °C. Kontrollen för primära antikroppen inkuberades istället med 1 x TBS. Påföljande dag tvättades tarmarna tre gånger med 1 x TBS, varefter tarmarna inkuberades i sekundära antikroppen i 30

minuter vid rumstemperatur. Primära och sekundära antikropparna var utspädda i 5 % NGS utlöst i 1 x TBS enligt koncentrationerna i tabell 3. Tarmarna tvättades efteråt tre gånger med 1 x TBS och motfärgades därefter med Hoechst (10 µg/ml) i tre minuter. Därefter tvättades tarmarna med 1 x TBS och monteringsmedia applicerades på objektglasen. Tarmarna förvarades i mörka förhållanden vid 4 °C. Konfokalmikroskop (Leica TCS SP8 CARS, Leica, Wetzlar, Tyskland) samt fluorescencemikroskop (Zeiss Axio Imager, Zeiss, Oberkochen, Tyskland) användes för att fotografera proven efter immunofärgning. Programmen LAS X och ZEN 3 användes för att analysera resultaten. Dessutom användes maskinen Panoramic 250 Flash III (3DHISTECH, Budapest, Ungern) för att skanna proven. Programmet CaseViewer användes för att analysera de skannade bilderna.



Figur 10. Översikt av principen för immunofärgning. Den primära antikroppen binder till målproteinet i fixerade vävnaden. Därefter binder den sekundära antikroppen till den primära antikroppen. Den sekundära antikroppen är konjugerad med fluoroforer som emitterar ljus när specifika excitationsvåglängder belyses på vävnaden. Ljuset kan detekteras i fluorescens- samt konfokalmikroskop.

Tabell 3. Primära och sekundära antikroppar som användes för immunofärgning.

Primär antikropp	Utspädning	Leverantör
kanin anti- β III tubulin (ab18207)	1:250	Abcam, Cambridge, England
höna anti-gfp (ab13970)	1:250	Abcam, Cambridge, England
Sekundär antikropp	Utspädning	Leverantör
Alexa Fluor anti-kanin 488 (A-21206)	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor anti- höna 594 (A-11042)	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

4.6 Statistik

Resultaten analyserades med hjälp av t-test och envägs variansanalys (ANOVA) i statistikprogrammet GraphPad Prism 8. T-test användes för att analysera två grupper medan envägs ANOVA användes för att analysera tre grupper. Resultaten anges som medeltal \pm medelvärdets medelfel. Statistik signifikant ansågs p-värde under 0,05. I figurerna anger symbolerna ns ett p-värde över 0,05 och symbolerna * ett p-värde under 0,05, ** ett p-värde under 0,01 och *** ett p-värde under 0,001.

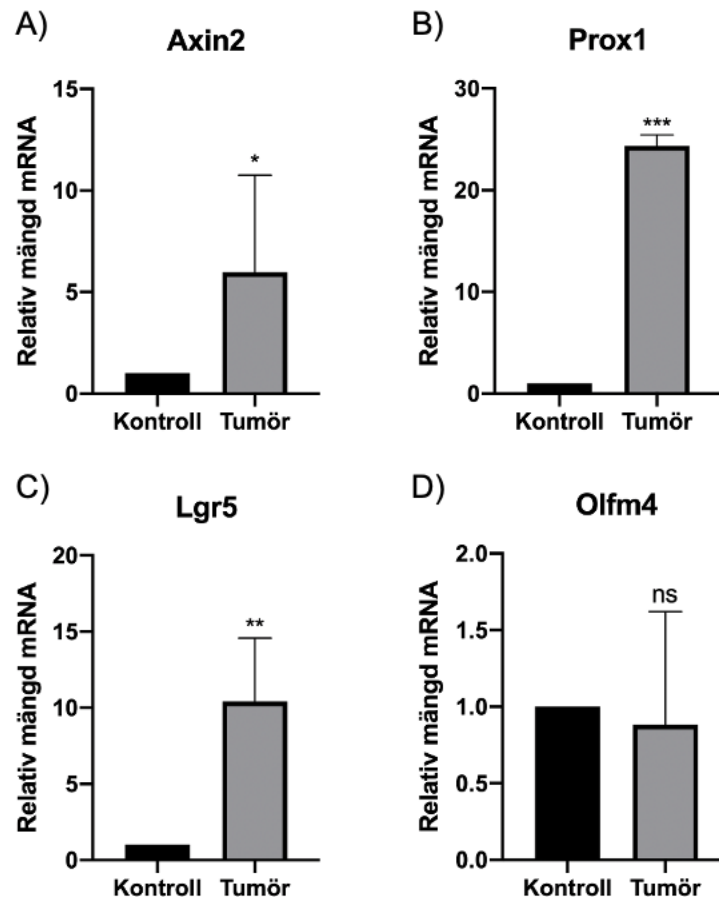
5 Resultat

5.1 Undersökning av Wnt- och GDNF-RET-signaleringsmarkörernas genuttryck i APC-muterat tarmepitel

Eftersom påverkan av GDNF-RET-signalering i tjocktarmscancer inte är fullständigt klargjord var det av intresse att undersöka ifall mRNA-uttrycket av GFL:er och GFR:er förändras i APC^{Min/+}-muterat tarmepitel (tumörvävnad) jämfört med normal vävnad (kontrollvävnad bredvid tumörerna). Dessutom undersöktes mRNA-uttrycket av stamcellsmarkörerna Lgr5 och Olfm4 samt mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörerna Axin2 och Prox1. Undersökningen utfördes med hjälp av RT-qPCR-analys. Resultaten från RT-qPCR-analysen normaliserades genom att normalisera markörernas Ct-värden med hushållsgenens (β -aktin) Ct-värde. Därefter normaliserades markörernas uttryck till kontrollen som hade värdet 1.

5.1.1 Markörerna för Wnt-signalering är signifikant uppreglerade i APC-muterat tarmepitel

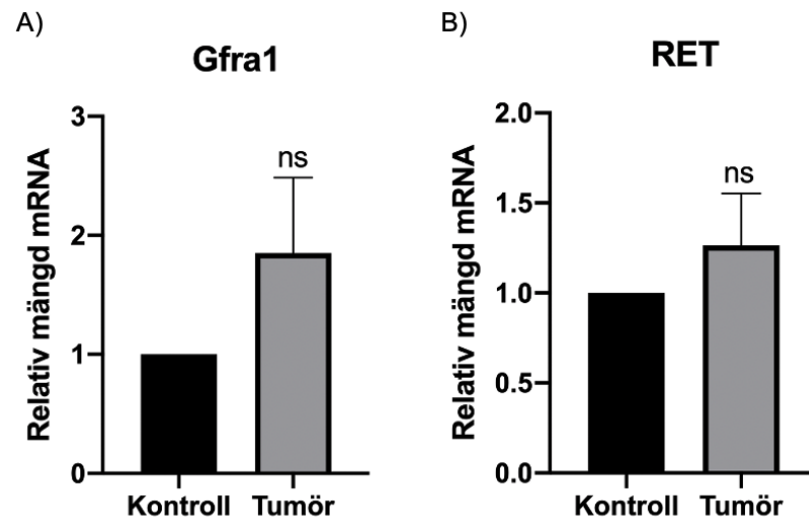
Eftersom inaktivering av tumörsuppressorgen APC leder ofta till att Wnt-signaleringsräckan aktiveras (Farrall et al., 2012), undersöktes om mRNA-uttrycket av Wnt-signalerings- och stamcellsmarkörer är uppreglerade i APC-muterat tarmepitel. Resultaten från RT-qPCR påvisar en signifikant uppreglering i mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörerna Axin2 och Prox1 i tumörerna jämfört med kontrollen (figur 11 A och B). Axin2 har påvisats främja tjocktarmscancer och Prox1 har föreslagits som en tumörsuppressorgen samt regleras av Wnt-signaleringsräckan (Wu et al., 2012). Dessutom har det påvisats att Prox1 uppregleras i tjocktarmscancer (Petrova et al., 2008). Resultaten påvisar också en signifikant uppreglering i mRNA-uttrycket av stamcellsmarkören Lgr5 (figur 11 C) medan mRNA-uttrycket av stamcellsmarkören Olfm4 inte är förändrad i tumörerna (figur 11 D). Lgr5 påvisar också en uppreglerad Wnt-signalering, eftersom Lgr5 bildar ligander med R-spondin som främjar Wnt-signalering (Cramer et al., 2015).



Figur 11. mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörer och stamcellsmarkörer i APC^{Min/+}-tumörer jämfört med kontrollvävnad från tunntarmen. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes mRNA-uttrycket av Axin2, Prox1, Lgr5 och Olfm4 i APC^{Min/+}-tumör- och kontrollvävnad. **A)** Relativa mRNA-uttrycket av Axin2. **B)** Relativa mRNA-uttrycket av Prox1. **C)** Relativa mRNA-uttrycket av Lgr5. **D)** Relativa mRNA-uttrycket av Olfm4. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades tumörernas genuttryck mot kontrollens genuttryck. Statistisk analys utfördes med hjälp av t-test. Signifikansen anges med * som representerar ett p-värde på $\leq 0,05$, med ** som representerar ett p-värde på $\leq 0,01$, med *** som representerar ett p-värde på $\leq 0,001$ och icke-signifikanta resultat med ns som representerat ett p-värde över 0,05. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=5).

5.1.2 GDNF-RET-signaleringen är inte förändrad i APC-muterat tarmepitel

För att undersöka ifall GDNF-RET-signalering är förändrad i APC-muterat tarmepitel undersöktes mRNA-uttrycket av GFR Gfra1 och tyrosinkinasreceptorn RET. Resultaten från RT-qPCR påvisar ingen förändring i mRNA-uttrycket av Gfra1 som fungerar som en receptor för GDNF (figur 12 A). Dessutom påvisar resultaten ingen förändring i mRNA-uttrycket av RET (figur 12 B).



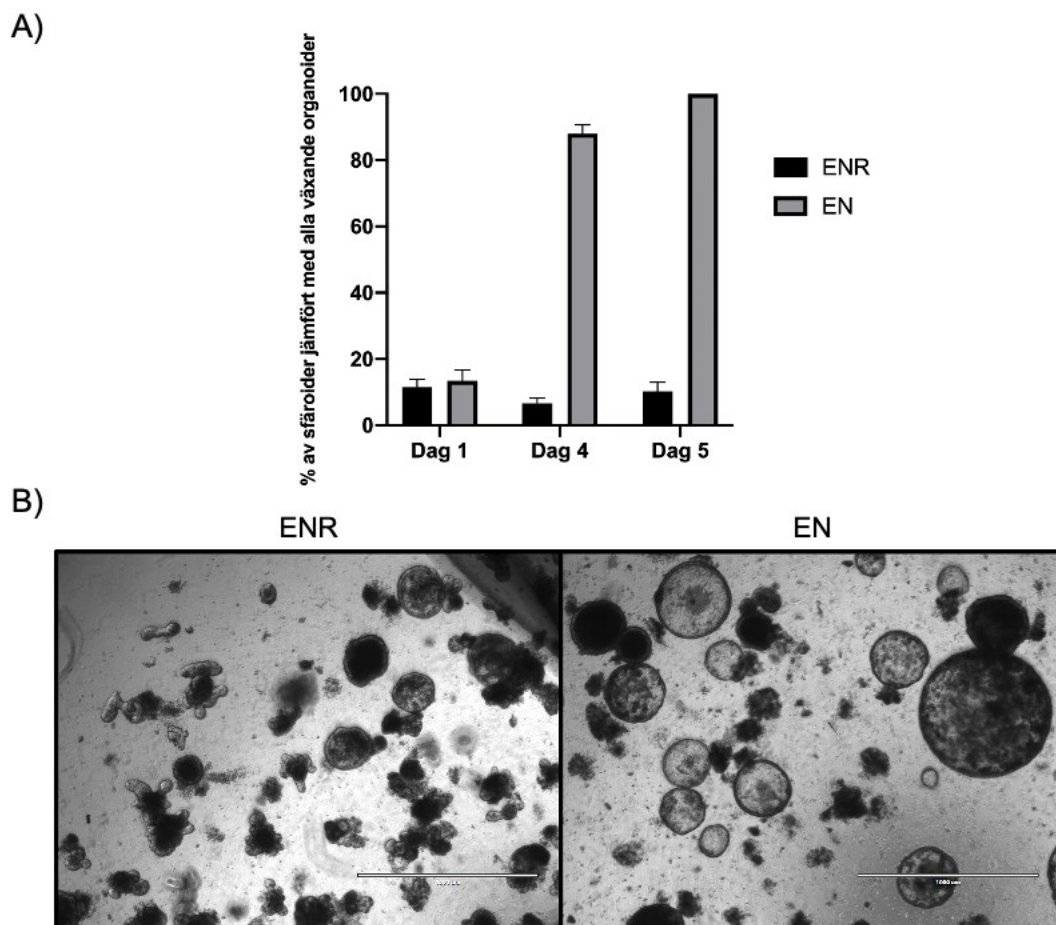
Figur 12. mRNA-uttrycket av Gfra1 och RET i APC^{Min/+}-tumörer och kontrollvävnad från tunntarmen. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes genuttrycket av Gfra1 och RET i tumör- och kontrollvävnad. **A)** Relativa mRNA-uttrycket av Gfra1. **B)** Relativa mRNA-uttrycket av RET. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades tumörernas genuttryck mot kontrollens genuttryck. Statistisk analys utfördes med hjälp av t-test. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerat ett p-värde över 0,05. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=5).

5.2 Etablering av APC^{Min/Min}-organoidkultur

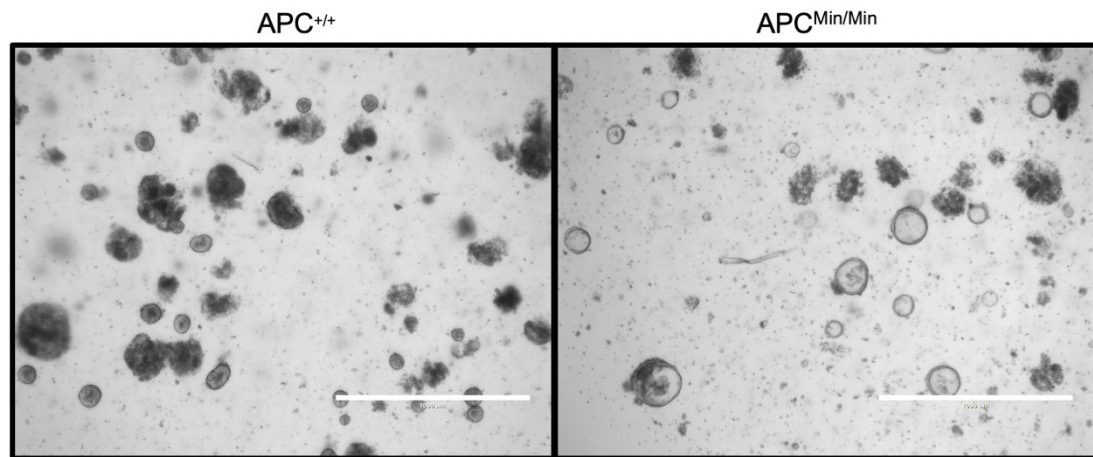
Eftersom båda allelerna av APC-genen muteras vid tjocktarmscancer, var de av intresse att undersöka hur epitelet påverkas av GDNF-RET-signalering i APC^{Min/Min}-organoider som fungerar som en modell för tidig tjocktarmscancer. För att möss med homozygota APC^{Min}-alleler dör tidigt under embryonal utveckling (Zeineldin & Neufeld, 2013), var målet att skapa APC^{Min/Min}-organoider från APC^{Min/+}-möss. Organoiderna som härstammade från APC^{Min/+}-möss och odlades i EN-media (utan R-spondin, Wnt aktiverare) överlevde inte. Dessa resultat presenteras inte i detta gradu-projekt, eftersom i denna studie fokuseras det endast på organoider som behandlades med R-spondin. I andra strategin odlades organoiderna härstammade från APC^{Min/+}-möss till början med ENR-media. De första veckorna växte endast enstaka sfäroider i ENR-kulturen. Vid dag 22 hade 7–16 % av alla organoider som odlades i ENR utvecklats till sfäroider. När sfäroiderna uppfyllde 10 % av alla de växande organoiderna, byttes median från ENR- till EN-media i 50 % av organoidkulturerna.

Nästa dag (dag 1) hade antalet sfäroider stigit till 13 % i organoidkulturerna med EN-media. I ENR-media var motsvarande antalet sfäroider 11 % (figur 13 A). Vid dag 4 kunde en mycket tydlig skillnad ses mellan antalet växande sfäroider i ENR- och EN-media. I EN-media hade sfäroidernas antal stigit till 88 % av alla organoiderna (figur 13 A). Vid dag 5 växte det endast sfäroider i EN-media. I ENR-media var motsvarande antalet sfäroider 10 % vid dag 5 (figur 13 A och B).

Som en kontroll för $APC^{Min/Min}$ -organoiderna odlades vildtypsorganoider ($APC^{+/+}$). Vildtypsorganoiderna borde upprätthålla krypt-villus-arkitekturen och inte förändra sin fenotyp till sfäroider. Ingen förändring noterades i vildtypsorganoiderna (figur 14). Sfäroiderna behandlades därefter med rekombinant GDNF och Gfra1 eller med RET-hämmaren Pz-1 för fortsatta experiment.



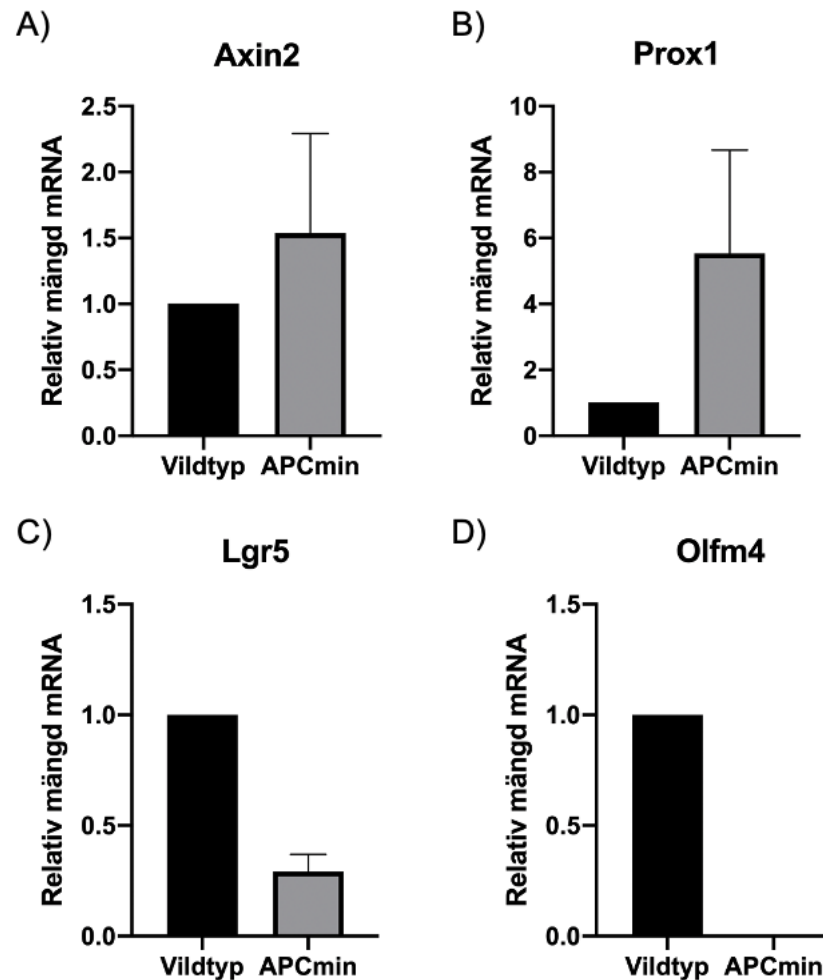
Figur 13. $APC^{Min/Min}$ -sfäroidernas mängd i ENR- och EN-media. Sfäroiderna behandlades antingen med ENR- eller med EN-media. **A)** Antalet sfäroider (%) jämfört med alla växande organoider i ENR- och EN-media vid dag 1, 4 och 5. **B)** Representativ bild över antalet sfäroider i ENR- och EN-media vid dag 5. Skala 1000 μm .



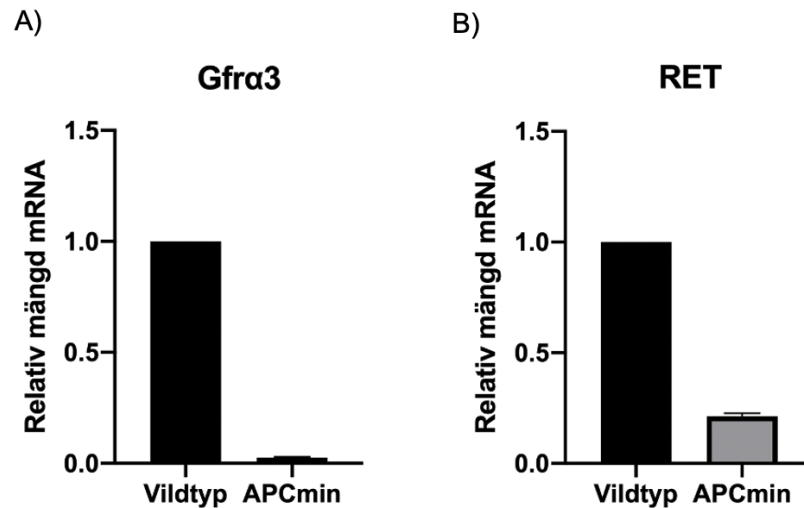
Figur 14. Fenotypen förändras hos $APC^{Min/Min}$ -organoider men inte hos vildtypsorganoider. $APC^{Min/Min}$ -organoider växer som sfäroider medan vildtypsorganoider ($APC^{+/+}$) växer enligt krypt-villus-arkitekturen i ENR-media, dag 20. Skala 1000 μm .

5.3 Uttrycket av Wnt-signalerings- och GDNF-RET-signaleringsmarkörer i $APC^{Min/Min}$ -sfäroider

Eftersom resultaten från tidigare experiment påvisade att Wnt-signaleringsmarkörerna är uppreglerade i APC^{min} -muterat tarmepitel, undersöktes mRNA-uttrycket av Wnt- och GDNF-RET-signaleringsmarkörerna på $APC^{Min/Min}$ -sfäroiderna med hjälp av RT-qPCR. Resultaten antyder att Wnt-signaleringsmarkörerna Axin2 och Prox1 är uppreglerade i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna (figur 15 A och B). Till skillnad från APC -muterat tarmepitel antyder resultaten på att mRNA-uttrycket av stamcellsmarkören Lgr5 är nedreglerat i $APC^{Min/Min}$ -sfäroiderna (figur 15 C). Resultaten antyder även på att mRNA-uttrycket av stamcellsmarkören Olfm4 är nedreglerat i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna (figur 15 D). För att studera mRNA-uttrycket av GDNF-RET-signaleringsmarkörerna undersöktes genuttrycket av GFL:er och GFR:er i sfäroiderna. Resultaten antyder att Gfra3 (receptor för artemin) och RET är nedreglerade i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna (figur 16 A och B).



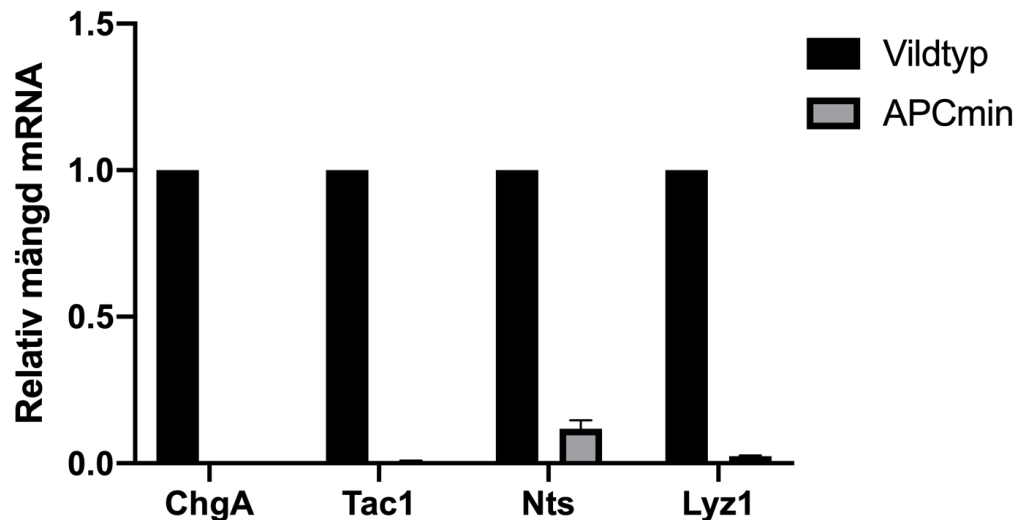
Figur 15. mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörer och stamcellsmarkörer i APC^{Min/Min}-sfäroider jämfört med vildtypsorganoider. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes mängden genuttryck av Axin2, Prox1, Lgr5 och Olfm4 i sfäroider och vildtypsorganoider. **A)** Relativa mRNA-uttrycket av Axin2. **B)** Relativa mRNA-uttrycket av Prox1. **C)** Relativa mRNA-uttrycket av Lgr5. **D)** Relativa mRNA-uttrycket av Olfm4. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades sfäroidernas (APCmin) genuttryck mot vildtypsorganoidernas genuttryck. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=2). Eftersom detta experiment har upprepats två gånger kan inga statistiska analyser utföras.



Figur 16. mRNA-uttrycket av Gfra3 och RET i APC^{Min/Min}-sfäroider jämfört med vildtypsorganoider. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes mängden genuttryck av Gfra3 och RET i sfäroider och vildtypsorganoider. **A)** Relativa mRNA-uttrycket av Gfra3. **B)** Relativa mRNA-uttrycket av RET. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades sfäroidernas (APCmin) genuttryck mot vildtypsorganoidernas genuttryck. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=2). Eftersom detta experiment har upprepats två gånger kan inga statistiska analyser utföras.

5.4 mRNA-uttrycket av markörer för differentierade celler är nedreglerade i APC^{Min/Min}-sfäroider

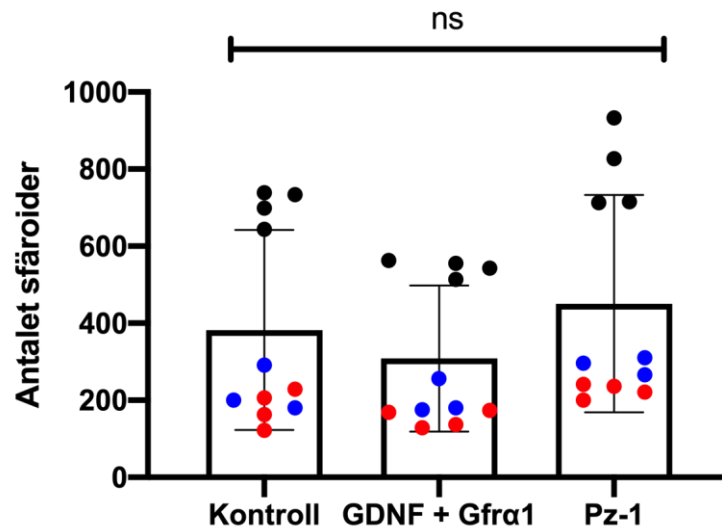
Eftersom studier har påvisat att antalet differentierade celler i tarmen är mindre hos homozygota Apc^{Min/Min}-möss än vildtypmöss (Sansom et al., 2004), undersöktes hur mRNA-uttrycket av differentierade epitelcellmarkörer förändras i APC^{Min/Min}-organoider. Med hjälp av RT-qPCR erhöles resultaten som tyder på att mRNA-uttrycket av enteroendokrinacellmarkörerna ChgA, Tac1 och Nts är nedreglerade i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna (figur 17). Dessutom antyder resultaten att uttrycket av panethcellmarkören Lyz1 är nedreglerat i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna (figur 17).



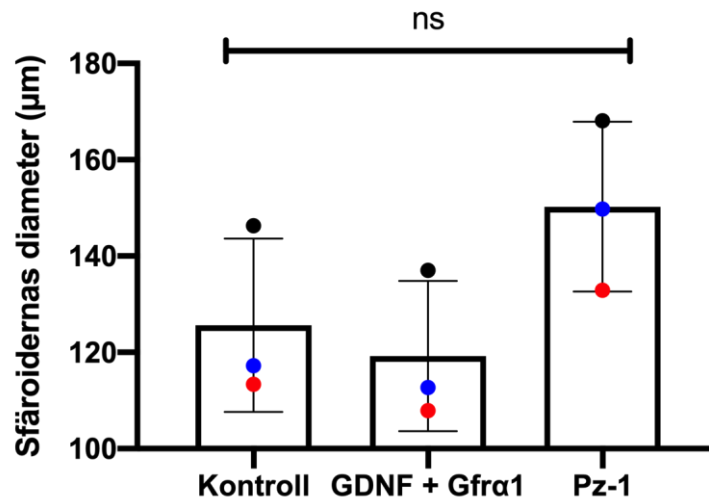
Figur 17. mRNA-uttrycket av differentierade cellmarkörer i APC^{Min/Min}-sfäroider jämfört med vildtypsorganoider. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes mängden genuttryck av ChgA, Tac1, Nts och Lyz1 i sfäroider och vildtypsorganoider. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades sfäroidernas (APC^{min}) genuttryck mot vildtypsorganoidernas genuttryck. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=2). Eftersom detta experiment har upprepats två gånger kan inga statistiska analyser utföras.

5.5 Behandling med GDNF och RET-hämmaren Pz-1 har ingen effekt på antalet sfäroider eller deras storlek

För att bättre förstå hur GDNF-RET-signaleringsvägen påverkar proliferationen av APC^{Min/Min}-sfäroiderna undersöktes effekten av rekombinant GDNF och Gfr α 1 som båda ökar GDNF-RET-signaleringsvägen. Dessutom undersöktes effekten av RET-hämmaren Pz-1 på sfäroiderna. Sfäroiderna behandlades antingen med 1 μ M av Pz-1 eller med 100 ng/ml av GDNF och 100 ng/ml av Gfr α 1. Resultaten påvisar att rekombinant GDNF och Gfr α 1 eller hämning av RET inte har en effekt på antalet sfäroider (figur 18) eller deras storlek (figur 19). Storleken av sfäroiderna analyserades genom att räkna diametern av sfäroiderna.



Figur 18. Sfäroidernas proliferation vid behandling med GDNF + Gfra1 och Pz-1. Sfäroiderna behandlades antingen med GDNF och Gfra1 eller med RET-hämmaren Pz-1. De olika färgerna representerar skilda experiment, varav varje cirkel representerar en brunn i organoidkulturen. Statistisk analys utfördes med envägs ANOVA med post hoc-testet Bonferroni. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerat ett p-värde över 0,05. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

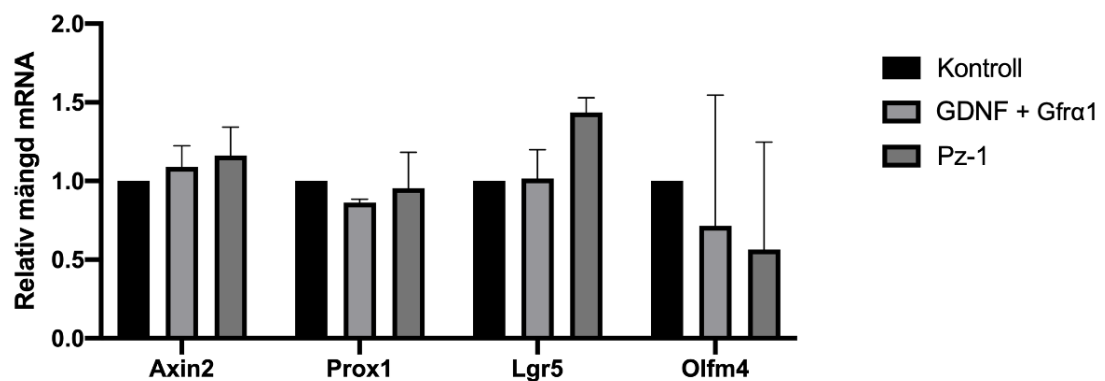


Figur 19. Sfäroidernas storlek vid behandling med GDNF + Gfra1 och Pz-1. Sfäroiderna behandlades antingen med GDNF och Gfra1 eller med RET-hämmaren Pz-1. De olika färgerna representerar skilda experiment. Statistisk analys utfördes med envägs ANOVA med post hoc-testet Bonferroni. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerat ett p-värde över 0,05. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

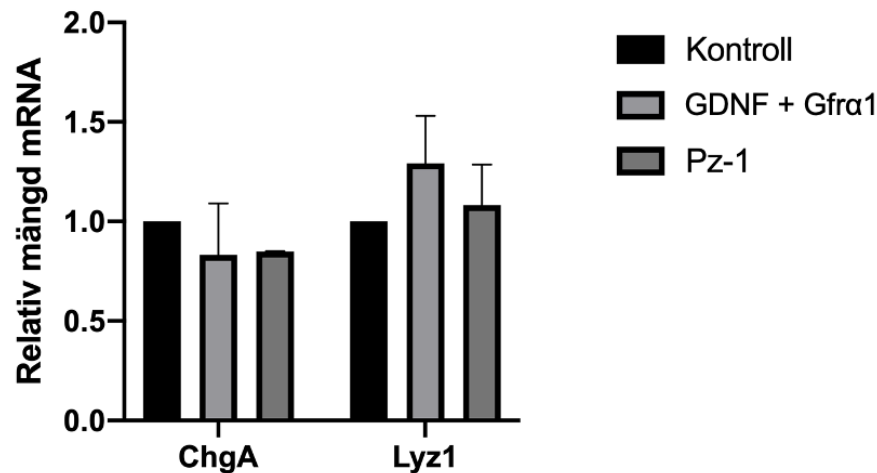
5.6 mRNA-uttrycket av stamcell- samt epitelcellmarkörer förändras inte i GDNF och Gfr α 1- eller Pz-1-behandlade sfäroider

För att undersöka hur GDNF-RET-signalering påverkar mRNA-uttrycket av differentierade epitelcell-, Wnt-signalerings- samt stamcellsmarkörer i APC^{Min/Min}-sfäroider, analyserades specifika geners mRNA-uttryck med hjälp av RT-qPCR. Resultaten antyder att GDNF och Gfr α 1 samt RET-hämmaren Pz-1 inte verkar ha en påverkan på mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörerna Axin2 och Prox1. Dessutom antyder resultaten på att mRNA-uttrycket av stamcellsmarkörerna Lgr5 och Olfm4 påverkas varken av GDNF och Gfr α 1 eller Pz-1 (figur 20).

För att undersöka ifall mRNA-uttrycket av differentierade cellmarkörer påverkas av behandlingen med GDNF och Gfr α 1 eller Pz-1 analyserades genmarkörerna för ChgA (EEC) och Lyz1 (panethceller). Resultaten antyder att mRNA-uttrycket av ChgA samt Lyz1 inte förändras när sfäroiderna behandlas med GDNF och Gfr α 1 eller med Pz-1 (figur 21).



Figur 20. mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörer och stamcellsmarkörer i APC^{Min/Min}-sfäroider behandlade med GDNF + Gfr α 1 eller Pz-1. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes mängden genuttryck av Axin2, Prox1, Lgr5 och Olfm4 i sfäroider behandlade med GDNF och Gfr α 1 eller Pz-1. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades behandlade sfäroidernas genuttryck mot kontrollens genuttryck. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=2). Eftersom detta experiment har upprepats två gånger kan inga statistiska analyser utföras.



Figur 21. mRNA-uttrycket av differentierade cellermarkörer i sfäroider behandlade med GDNF + Gfra1 eller Pz-1. Med hjälp av RT-qPCR-metoden undersöktes mängden genuttryck av ChgA och Lyz1 i sfäroider behandlade med GDNF och Gfra1 eller Pz-1. Resultaten analyserades genom att först normalisera markörernas genuttryck med genuttrycket av hushållsgenen β -aktin. Därefter normaliserades behandlade sfäroidernas genuttryck mot kontrollens genuttryck. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=2). Eftersom detta experiment har upprepats två gånger kan inga statistiska analyser utföras.

5.7 Uttrycket av AAV-medierad GFP-signal i tunn- och tjocktarmen

Sista målet med denna pro gradu-projekt var att utveckla en fungerande metod för att transducera möss med en GDNF-överuttryckande plasmid. Före GDNF-experimentet utfördes ett pilotexperiment utan GDNF som presenteras i detta pro gradu-projekt. Mössen transducerades med hjälp av AAV-medierad transduktion men vilken viral serotyp som är mest effektiv för experimentet måste undersökas. För att undersöka effektiviteten och lokaliseringen av de olika serotyperna laddades virusen med en GFP-plasmid. Därför transducerades mössen med AAV-serotyp 8 och AAV-serotyp 9 (tabell 4). Serotyp transducerades dessutom i två olika koncentrationer: 5×10^{11} (A) och 1×10^{12} (B). Kontrollerna transducerades med samma koncentration som sampelmen med PBS utan viruspartiklar.

Tarmen isolerades från mössen antingen 4 dagar eller 24 dagar efter transduktion. Tarmarna från 4 dagar eller 24 dagar efter transduktion med samma serotyp och koncentration jämfördes sinsemellan för att analysera transduktionseffektiviteten. Tarmarna immunofärgades både mot GFP samt β 3T som uttrycks i neuroner.

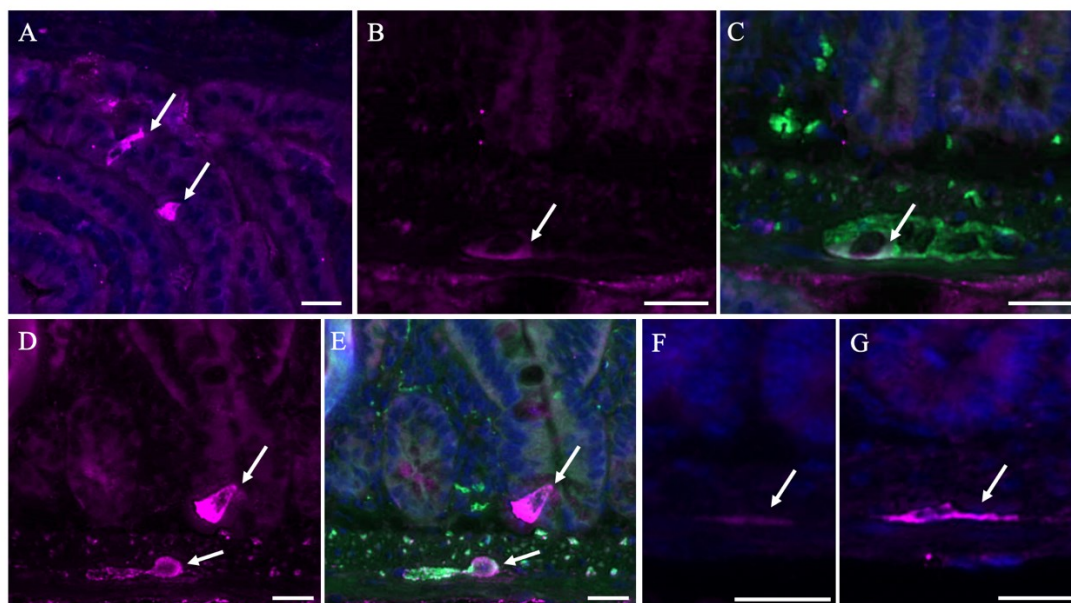
Tabell 4. Serotyperna som användes i experimentet.

Serotyp	Koncentration (viruspartiklar/mus)	Isolerades dag:
Serotyp 8	5×10^{11}	4
Serotyp 8	5×10^{11}	24
Serotyp 9 (A)	5×10^{11}	4
Serotyp 9 (A)	5×10^{11}	24
Serotyp 9 (B)	1×10^{12}	4
Serotyp 9 (B)	1×10^{12}	24

5.7.1 Uttrycket av AAV-medierad GFP-signal i tunntarmen

I resultaten från immunofärgning noterades det att tunntarmen som transducerades med serotyp 9 (B) och isolerades 4 dagar senare uttrycker GFP-signal i epitelcellerna som finns i villi (figur 22 A) och i neuroner markerade med $\beta 3T$ (figur 22 B och C). När tarmen isolerades 24 dagar efter transduktionen noterades det en förändring i uttrycket av GFP-signalen. GFP-signalen uttrycktes i både neuroner samt epitelceller (figur 22 D och E) som finns i kryptbasen. Ingen GFP-signal noterades i tunntarmen som transducerades med serotyp 9 (A), varken 4 dagar efter transduktionen eller 24 dagar efter transduktionen.

Tunntarmarna som var transducerade med serotyp 8 uttrycker GFP-signal i muskelskiktet. I tunntarmen som isolerades 4 dagar efter transduktionen noterades endast en svag GFP-signal i muskelskiktet (figur 22 F). Däremot noterades en starkare GFP-signal i tunntarmen som isolerades 24 dagar efter transduktionen (figur 22 G). I tabell 5 presenteras en sammanfattning över var i tunntarmen de olika virala serotyperna uttrycker GFP-signal.



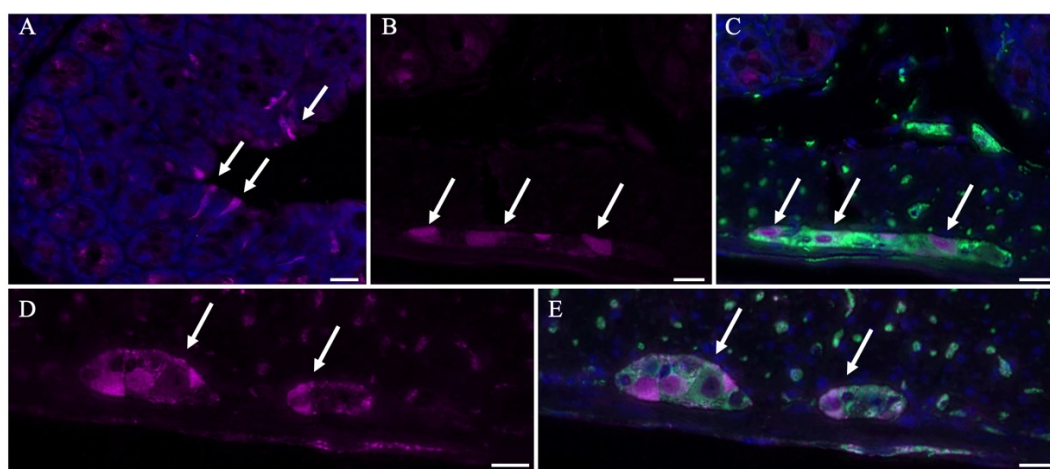
Figur 22. Uttrycket av AAV-GFP i tunntarmen. **A)** Representativ immunofluorescensbild av villi med GFP-uttryckande epitelceller (Serotyp 9, B, dag 4). **B)** Representativ immunofluorescensbild av muskelskiktet (Muscularis externa) med GFP-uttryckande neuron (Serotyp 9, B, dag 4). **C)** En sammanslagen immunofluorescensbild av bild B med Hoescht, GFP och $\beta 3T$. **D)** Representativ immunofluorescensbild av kryptbasen och muskelskiktet med en GFP-uttryckande epitelcell och neuron (Serotyp 9, B, dag 24). **E)** En sammanslagen immunofluorescensbild av bild D med Hoescht, GFP och $\beta 3T$. **F)** Representativ immunofluorescensbild av muskelskiktet (Muscularis externa) med GFP-signal (Serotyp 8, dag 4). **G)** Representativ immunofluorescensbild av muskelskiktet (Muscularis externa) med GFP-signal (Serotyp 8, dag 24). Blåa färgen representerar Hoescht, gröna färgen $\beta 3T$ och violetta färgen GFP (vit pil). Skala 20 μm , (n=1).

Tabell 5. Sammanfattning av GFP-uttrycket i tunntarmen.

Serotyp	Dag	GFP-uttryck
8	4	Svagt uttryck i muskelskiktet
8	24	Muskelskitet
9 (A)	4	-
9 (A)	24	-
9 (B)	4	Epitelceller (villi), neuroner
9 (B)	24	Epitelceller (kryptor), neuroner

5.7.2 Uttrycket av AAV-medierad GFP-signal i tjocktarmen

Från immunofluorescensbilderna kan det noteras en GFP-signal endast i tjocktarmarna som var transducerade med serotyp 9 (B). Dessutom kan det noteras att tjocktarmen som isolerades 4 dagar efter transduktionen uttrycker GFP-signal både i epitelceller (figur 23 A) och i neuroner markerade med β 3T (figur 23 B och C). I tjocktarmen som isolerades 24 dagar efter transduktionen noterades GFP-signal endast i neuronerna (figur 23 D och E). I tabell 6 presenteras en sammanfattning över var i tjocktarmen de olika virala serotyperna uttrycker GFP-signal.



Figur 23. Uttrycket av AAV-GFP i tjocktarmen. **A)** Representativ immunofluorescensbild av kryptor med GFP-uttryckande epitelceller (Serotyp 9, B, dag 4). **B)** Representativ immunofluorescensbild av muskelskiktet (Muscularis externa) med GFP-uttryckande neuroner (Serotyp 9, B, dag 4). **C)** En sammanslagen immunofluorescensbild av bild B med Hoescht, GFP och β 3T. **D)** Representativ immunofluorescensbild av muskelskiktet med GFP-uttryckande neuroner (Serotyp 9, B, dag 24). **E)** En sammanslagen immunofluorescensbild av bild D med Hoescht, GFP och β 3T. Blåa färgen representerar Hoescht, gröna färgen β 3T och violetta färgen GFP (vit pil). Skala 20 μ m, (n=1).

Tabell 6. Sammanfattning av GFP-uttrycket i tjocktarmen.

Serotyp	Dag	GFP-uttryck
8	4	-
8	24	-
9 (A)	4	-
9 (A)	24	-
9 (B)	4	Epitelceller, neuroner
9 (B)	24	Neuroner

6 Diskussion

Inom cancerforskningen används möss som en modellorganism eftersom musen är genetiskt väldigt lik med människan. Modellorganismer tillåter forskare att bättre förstå vad som förändras på cellulär- och molekylär nivå vid olika sjukdomar. För att studera effekten av specifika kemikalier och läkemedel krävs modellsystem som härmar mikromiljön *in vivo*. För att studera tarmfunktioner samt cellulära processer i tarmen, har det utvecklats förenklade 3D versioner av tarmen *in vitro* och dessa kallas för tarmorganoider.

Ett viktigt kännetecken för sporadisk tjocktarmscancer är inaktiveringen av APC-genen som är en negativ reglerare av Wnt-signaleringsräckan (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018). Tjocktarmscancer uppstår genom en gradvis serie av mutationer i onkogener och tumörsuppressorgener, inklusive APC (Fodde, 2002). GDNF-RET-signalering upprätthåller bland annat proliferationen av enteriska neuroner och epitelprekursorceller (Perea et al., 2017). GDNF-RET-signaleringens roll i tjocktarmscancer är tillsvidare oklar.

6.1 Wnt-signalering är signifikant uppreglerad i tumörer

I detta *pro gradu*-projekt isolerades tumörer och frisk vävnad bredvid tumörerna (kontrollvävnad) från mössens tunntarmar. Genuttryck av Wnt-signalerings- samt stamcellsmarkörer analyserades därefter med hjälp av RT-qPCR metoden. Vid jämförelse av Axin2-, Prox1- och Lgr5-mRNA-uttrycket i tumörvävnad och kontrollvävnad påvisas det att Wnt-signaleringsmarkörer är signifikant uppreglerade i tumörerna (figur 11 A–C). Eftersom Wnt-signaleringsmarkörerna är uppreglerade i tumörerna antyder det också på att själva Wnt-signaleringsräckan är uppreglerad i tumörerna. Resultaten är förväntade eftersom aktivering av Wnt-signaleringsräckan betraktas som den initierande händelsen i tjocktarmscancer. Dessutom har studier påvisat att Prox1 uppregleras i tjocktarmscancer (Petrova et al., 2008). Lgr5-positiva stamceller har påvisats var ansvariga för tarmvävnadsförnyelse (Yan et al., 2015). Eftersom mRNA-uttrycket av stamcellsmarkören Lgr5 är uppreglerad i tumörerna kunde detta även antyda på att tumörerna består av stamceller som uttrycker mera Lgr5

än kontrollvävnaden. Därmed kunde det antyda på att stamcellerna i tumörvävnaden prolifererar snabbare än normala vävnaden.

Resultaten påvisar att mRNA-uttrycket av stamcellsmarkören *Olfm4* är oförändrad i tumörerna jämfört med kontrollvävnaden (figur 11 D). Förutom att *Olfm4* är en markör för tarmens stamceller är *Olfm4* också en negativ reglerare för Wnt-signaleringsräckan. Studier har påvisat att genuttrycket av *Olfm4* uppregleras i tjocktarmscancer hos människan men genuttrycket nedregleras eller förloras i senare stadier av sjukdomen (Liu et al., 2016). *Olfm4* har en antiapoptotisk påverkan och främjar proliferationen av cancerceller (Koshida et al., 2007; Yu et al., 2011). Eftersom tumörvävnaden i detta experiment härstammade ur tunntarmar kan skillnaden mellan litteraturen och resultaten bero på att *Olfm4* uttrycks annorlunda i tunntarmen än i tjocktarmen. Därtill kan mRNA-uttrycket av *Olfm4* skilja mellan mössen och människan.

6.2 GDNF-RET-signalering förändras inte i tunntarmens tumörvävnad

RET-signalering är involverad i bildningen samt upprätthållande av olika stamcelltyper och utvecklingsprocesser som reglerar bland annat proliferationen och differentieringen av celler. RET främjar dessutom Wnt-signalering i det utvecklande epitelet, eftersom RET är positivt återkopplad (eng. positive feedback loop) med Wnt-signaleringsräckan. Perea och kollegor har påvisat att RET upprätthåller proliferationen och differentieringen av epitelcellerna i tarmen (Perea et al., 2017).

Resultaten påvisar ingen signifikant effekt på uttrycket av *Gfra1* och RET i tunntarmstumörer jämfört med kontrollvävnad (Figur 12 A och B). Eftersom genuttrycket av *Gfra1* och RET undersöktes med hjälp av RT-qPCR metoden påvisar resultaten endast mängden mRNA och inte translationen av mRNA till färdigt protein. Därav även om en signifikant skillnad i mRNA-uttrycket av *Gfra1* och RET inte kan ses i tumörer jämfört med kontrollvävnad, kan det inte uteslutas att GDNF-RET-signalering förändras i tumörerna härstammade från tunntarmen.

I en studie av Luo och kollegor påvisades det att RET är en potentiell tumörsuppressorgen i tjocktarmscancer. Mutationer i RET har också påvisats i primär tjocktarmscancer. Det har diskuterats ifall liganderna i GDNF-RET-signaleringsräckan skulle kunna tjäna som onkogener i tjocktarmscancer. ARTN har påvisats att vara potentiellt onkogen vid bröst- och lungcancer. Ifall GFL:er skulle kunna fungera som onkogener i tjocktarmen är det möjligt att endast i en del av KRC-fallen uttrycks RET. Det är även möjligt att GFL:er kan ha onkogena effekter på ett RET-oberoende sätt, vilket inte förändrar GDNF-RET-signalerings vid KRC (Luo et al., 2013).

I detta projekt undersöktes även andra GFL:er (GDNF, ARTN, NRTN, PSPN) och GFR:er (Gfra2, Gfra3 och Gfra4) men eftersom det inte skedde någon amplifiering av mRNA i RT-qPCR experimenten antyder det att dessa gener sannolikt inte uttrycks i tunntarmsvävnaden. Orsaken till detta kan vara att GDNF-RET-signalerings sker endast i ett litet antal av celler i tunntarmens epitel. Det finns även möjligheten att något steg i RT-qPCR metoden inte lyckades, till exempel att primrarna inte fungerade. Primrarnas effektivitet kunde provas på vävnadsprov från mössens hjärna var GDNF uttrycks rikligt (Golden et al., 1998).

6.3 Etablering av APC^{Min/Min}-organoider (sfäroider)

Vid sporadisk tjocktarmscancer genomgår cellerna flera mutationer som leder bland annat till att båda allelerna av APC-genen inaktiveras (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018). För att undersöka ifall GDNF-RET-signalerings har en effekt på APC-muterat tarmepitel behövdes ett modellsystem där båda allelerna av APC är inaktiverade. Därmed var målet att växa tunntarmsorganoider härstammade från APC^{Min/+}-möss och selektivt växa de muterade APC^{Min/Min}-cellerna, eftersom de kan kännetecknas av fenotypförändringen från krypt-villus-arkitektur till sfäriska cyster (sfäroider)

Wnt-aktiveraren R-spondin krävs för att organoiderna (APC^{Min/+}) skall kunna växa medan APC^{Min/Min}-sfäroiderna har en hyperaktiv Wnt-signalerings som ger en fördel till dessa organoider och är oberoende av R-spondin för deras proliferation och överlevnad. I början av experimentet försöktes sfäroider odlas på två olika sätt. Den

första strategin utgick på att behandla organoiderna redan från början med EN-media (utan R-spondin). Det noterades snabbt att den låga mängden av sfäroiderna som växte i organoidkulturen överlevde inte behandlingen med EN-media. Detta gav hypotesen att sfäroidernas mängd måste vara högre för att sfäroiderna skulle kunna begå R-spondin oberoende proliferation. I den andra strategin behandlades organoiderna i början med ENR-media. Efter några passager (delande) av organoiderna observerades det att antalet sfäroider ökade bland alla växande organoider. När sfäroidernas mängd var cirka 10 % av alla växande organoider byttes median till EN från ENR. Efter några dagar i EN noterades det att organoidernas ($APC^{Min/+}$) mängd hade minskat, resulterande av borttagande av R-spondin. Överraskande nog hade inte bara sfäroiderna överlevt utan också ökat i antal. Vid dag 5 växte det endast sfäroider ($APC^{Min/Min}$) i organoidkulturen som hade EN-media. Därav lyckades etableringen av $APC^{Min/Min}$ -organoidkultur. Slutsatsen drogs att antalet sfäroider måste vara tillräckligt hög för att kunna nå en R-spondin oberoende proliferation av sfäroider.

6.4 Wnt- och GDNF-RET-signalering i sfäroider

Resultaten antyder att mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörerna Axin2 och Prox1 är uppreglerade i sfäroiderna (figur 15) i likhet med tumörerna (figur 11). Resultatet stöds av litteraturen där det kommer fram att $APC^{Min/Min}$ -organoider har en hyperaktiv Wnt-signalering (Langlands et al., 2018). Dessutom antyder resultaten på att mRNA-uttrycket av Lgr5 är nedreglerat i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoider. Detta är intressant eftersom vissa studier har påvisat att genuttrycket av Lgr5 är uppreglerat i sfäroider medan andra studier har påvisat att sfäroider består delvis av Lgr5-oberoende prekursorceller (Mustata et al., 2013). Det vore intressant att utföra immunofärgning med en antikropp mot Lgr5 på sfäroiderna och jämföra antalet stamceller i sfäroiderna med vildtypsorganoiderna. Dessutom antyder resultaten på att genuttrycket av Olfm4 är nedreglerat i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna. Utifrån dessa resultat kan inga slutsatser dras men resultaten kan möjligtvis antyda på att stamcellsmarkörerna är nedreglerade på grund av en förändring i sfäroidernas cellarkitektur. Eftersom genuttrycket av alla dessa gener har analyserats endast två gånger, borde experimentet upprepas för att försäkra antaganden och statistiska analyser utföras.

För att undersöka ifall GDNF-RET-signalerings förändras i sfäroiderna när båda allelerna av APC är inaktiverade, undersöktes mRNA-uttrycket av GFL:er (GDNF, ARTN, NRTN, PSPN) och GFR:er (Gfra1, Gfra2, Gfra3 och Gfra4) med hjälp av RT-qPCR-metoden. Även om mRNA-uttrycket av alla GFL:er och alla GFR:er undersöktes i denna studie kunde genuttrycket av endast Gfra3 och RET detekteras. Orsaken till detta kan vara att GDNF-RET-signalerings sker endast i ett litet antal av celler i sfäroiderna. Det finns även möjligheten att något steg i RT-qPCR metoden inte lyckades, till exempel att primrarna inte fungerade. Resultaten antyder att både Gfra3 och RET är nedreglerade i APC^{Min/Min}-sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna (figur 16). En studie av Sansom och kollegor påvisade att antalet differentierade celler är mindre i APC^{Min/Min}-tarmepitel (Sansom et al., 2004). Eftersom RET uttrycks bland annat i enteroendokrina- och enterokromaffina celler, det vill säga i differentierade epitelceller (Perea et al., 2017), kunde en möjlig orsak till resultaten vara att sfäroiderna har ett minskat antal av differentierade epitelceller. Eftersom experimentet har utförts endast två gånger borde detta upprepas för att kunna dra slutsatser.

Som ovannämnt har studien av Sansom och kollegor påvisat att antalet differentierade celler är mindre i APC^{Min/Min}-möss jämfört med APC^{Min/+}-möss. För att undersöka ifall genuttrycket av differentierade celler förändras i sfäroider analyserades mRNA-uttrycket av enteroendokrinacellmarkörerna ChgA, Nts och Tac1. Dessutom undersöktes mRNA-uttrycket av panethcellmarkören Lyz1. Resultaten i figur 17 antyder att mRNA-uttrycket av enteroendokrinacellmarkörerna och panethcellmarkören är nedreglerade i sfäroider jämfört med vildtypsorganoider. Eftersom resultaten antyder att mRNA-uttrycket av differentierade cellmarkörerna är nedreglerade i sfäroiderna kunde det möjligtvis antyda på att antalet differentierade celler är även mindre i sfäroiderna. De observerade resultaten stöds av Sansom och kollegors studie (Sansom et al., 2004). Eftersom experimentet har utförts endast två gånger borde detta upprepas för att kunna dra slutsatser.

6.5 GDNF-RET-signalering påverkar inte sfäroidernas mängd eller storlek

För att GDNF-RET-signaleringens roll är tillsvidare oklar i tjocktarmscancer undersöktes effekten av GDNF-RET-signalering på sfäroiderna. Målet var att undersöka ifall GDNF-RET-signalering har en påverkan på APC-muterat tarmepitel. GDNF-RET-signaleringsräckan stimulerades i sfäroiderna antingen genom att behandla sfäroiderna med rekombinant GDNF och Gfr α 1 som ökar GDNF-RET signalering eller med RET-hämmaren Pz-1. Resultaten påvisar att sfäroidernas antal eller storlek inte påverkas av GDNF-RET-signalering (figur 18 och 19). Även om ingen statistisk signifikans kunde ses mellan grupperna, noterades det i medeltal att Pz-1 ökade storleken och proliferationen av sfäroiderna. Detta kunde tyda på att GDNF-RET-signalering har någon okänd roll som hämmar cellproliferationen i tarmepitelet.

Det kan även påpekas att den stora variationen av antalet sfäroider och deras storlek i experimenten troligen orsakade en stor standardavvikelse. Detta kunde vara en orsak till att resultaten är icke-signifikanta. Stora standardavvikelser kan innebära att experimentet inte har utförts optimalt, till exempel biologisk variation. Eftersom antalet sfäroider räknades för hand skulle det kunna utvecklas en bättre metod som säkerställer att alla sfäroider räknas och räknas endast en gång. Den stora variationen i sfäroidernas storlek kan delvis bero på att sfäroiderna valdes slumpmässigt. Därmed har det kunnat påverka medeltalet av sfäroidernas storlek i skilda experimenten.

6.6 Stimulering med GDNF-RET-signalering påverkar inte Wnt-signalering eller mängden differentierade celler i sfäroider

Eftersom RET främjar Wnt-signalering och differentieringen av epitelceller i tarmepitelet samt upprätthåller proliferationen av epitelprekursorceller (Perea et al., 2017), var det av intresse att undersöka hur GDNF-RET-signalering påverkar APC-muterat tarmepitel. För tillfället är GDNF-RET-signaleringens roll dåligt förstådd i tjocktarmscancer. För att studera effekten av GDNF-RET-signalering på sfäroiderna stimulerades sfäroiderna antingen med rekombinant GDNF och Gfr α 1 eller med RET-

hämmaren Pz-1. Därefter undersöktes genuttrycket av Wnt-signaleringsmarkörer, stamcellsmarkörer samt markörer för differentierade celler med hjälp av RT-qPCR metoden.

Resultaten tyder på att mRNA-uttrycket av Wnt-signaleringsmarkörerna Axin2 och Prox1 samt stamcellsmarkörerna Lgr5 och Olfm5 inte förändras när sfäroiderna behandlades med GDNF och Gfr α 1 eller med Pz-1 (figur 20). Sfäroiderna är en modell för tidig tumörutveckling och har en hyperaktiv Wnt-signalering. En möjlig orsak till resultaten kan vara att Wnt-signalering sker i sfäroiderna genom ett RET-oberoende sätt. Även om RET främjar proliferationen av epitelprekursorceller (Perea et al., 2017) är det huvudsakligen Wnt- och Notch-signaleringsräckan som främjar proliferationen av prekursorcillerna och deras differentiering (Kaemmerer et al., 2019; Ogaki et al., 2013). Därmed är det möjligt att GDNF-RET-signalering har en mindre roll i regleringen av tarmens stamceller och behandling med GDNF-Gfr α 1 eller Pz-1 påverkar därför inte mRNA-uttrycken. Likaså antyder resultaten att mRNA-uttrycket av EEC-markören ChgA och panethcellmarkören Lyz1 inte förändras när sfäroiderna behandlas med GDNF-Gfr α 1 eller Pz-1 (figur 21). Det är även möjligt att GDNF-RET-signalering inte har en påverkan på mRNA-uttrycket av ChgA och Lyz1 ifall det inte finns differentierade celler i sfäroiderna. Resultaten i figur 17 tyder på att sfäroiderna består av ett minskat antal differentierade celler. På grund av att experimentet har utförts endast två gånger borde detta upprepas för att kunna säga ifall GDNF-RET-signalering påverkar sfäroidernas genuttryck. I fortsatta studier vore det intressant att utföra immunofärgning på sfäroiderna och undersöka ifall antalet stamceller och differentierade celler förändras i sfäroiderna efter GDNF-Gfr α 1 eller Pz-1 behandling.

6.7 Skillnader i AAV-serotypernas lokalisering

Ett ytterligare mål i detta pro gradu-projekt var att utveckla en fungerande metod för att transducera en GDNF-överuttryckande plasmid till möss med hjälp av AAV.

Transducering av GDNF möjliggör undersökningen av var och hur GDNF uttrycks i tarmepitelet. Eftersom metoden var ny för Ollilas forskningsgrupp måste först AAV-serotypers effektivitet och lokalisering studeras för att optimera den bästa serotypen

för experimentet. Mitt mål var att undersöka effektiviteten och lokaliseringen av AAV-medierad GFP och jämföra serotyperna 8 och 9 av AAV. Eftersom effektiviteten av serotyperna undersöktes, isolerades tarmarna (tunntarm och tjocktarm) ur mössen antingen 4 dagar eller 24 dagar efter transduktionen.

Resultaten antyder att serotyp 9 (B) uttrycker GFP-signal i tunntarmens (dag 4) epitelceller på toppen av villi och i muskelskiktets neuroner. GFP-signalen i neuronerna verifierades genom att immunofärga mot $\beta 3T$, som uttrycks specifikt i neuroner. Däremot i tunntarmen som isolerades 24 dagar efter transduktionen med samma serotyp noterades GFP-signal i kryptbasens epitelceller samt i muskelskiktets neuroner. Positionen av epitelcellen i kryptbasen antyder att GFP-signalen uttrycks i stamceller. För att bekräfta vilka epitelceller som uttrycker GFP-signal borde tarmarna färgas mot diverse epitelcellmarkörer samt stamcellsmarkörer. Resultaten antyder dessutom på att lokaliseringen av serotyp 9 inte är cellspecifik. Däremot noterades inget uttryck av GFP-signal i serotyp 9 (A), vilket antyder att virala koncentrationen möjligtvis är för låg. I tunntarmarna som transducerades med serotyp 8 noterades det endast GFP-signal i muskelskitet. GFP-signalen uttrycktes inte i neuroner eftersom $\beta 3T$ inte ko-lokaliserades med GFP-signalen. Däremot noterades det en förstärkt GFP-signal i tunntarmen isolerad 24 dagar efter transduktionen jämfört med tunntarmen som var isolerad 4 dagar efter transduktionen.

Resultaten från immunofärgning av tjocktarmen antyder att serotyp 9 (B) uttrycker GFP-signal i epitelceller och i neuroner 4 dagar efter transduktion. Dock noterades det att tjocktarmens epitelceller hade förlorat uttrycket av GFP-signal i tjocktarmen som isolerades 24 dagar efter transduktion. I tjocktarmarna transducerade med serotyp 9 (A) och serotyp 8 noterades ingen GFP-signal. Orsaken till att GFP-signal inte noterades med serotyp 8 och 9 (A) kunde bero på att virala koncentrationen är för låg.

GFP-signal i epitelcellerna observerades endast i enstaka villi och kryptor samt GFP-signalen i muskelskiktet noterades enbart på några ställen i tarmarna. Studier har påvisat att serotypernas effektivitet kan variera bland olika vävnader (Markakis et al., 2010). Därmed kan orsaken till den svaga effektiviteten bero på att serotyp 8 och 9 inte är de bästa vektorerna för att transducera tarmen. Dessutom är det möjligt att den bästa effektiviteten skulle observeras mellan dag 4 och 24 eller efter 24 dagar från

transduktionen. Därmed skulle experimentet kunna upprepas med andra serotyper och studera uttrycket av GFP-signalens i tarmen mellan dag 4 och 24 samt efter 24 dagar. I experimentet undersöktes hela tunntarmen samt tjocktarmen. Eftersom varje serotyps effektivitet vid dag 4 och 24 analyserades endast i en tunntarm eller tjocktarm borde experimentet upprepas för att dra slutsatser.

Följande steg var att transducera en GDNF-överuttryckande plasmid efter att serotypernas effektivitet och lokalisering var undersökt. På grund av brist på tid samt de bristfälliga resultaten från experimentet med GFP-vektorn var det inte möjligt att påbörja GDNF experimentet. I fortsatta experiment vore det intressant att undersökas vilka epitelceller uttrycker GDNF och ifall GDNF-uttrycket skulle förändras i APC^{Min/+}-möss jämfört med vildtypmöss.

6.8 Slutsatser och fortsatt studie

Den främsta målsättningen med detta pro gradu-projekt var att undersöka hur GDNF-RET-signalering påverkar APC-muterat tarmepitel. För att nå målet påbörjades projektet med att undersöka om GDNF-RET-signalering förändrades i APC^{Min/+}-mössens tarmepitel. Resultaten påvisar att GDNF-RET-signaleringen är oförändrad i APC-muterat tarmepitel men Wnt-signalering var signifikant uppreglerad. Eftersom APC^{Min/+}-mössen har endast en muterad allel av APC-genen, till skillnad från sporadisk tjocktarmscancer hos människan där APC-genen är inaktiverad, behövdes ett modellsystem för tjocktarmscancer. Projektet fortsattes därmed med att etablera APC^{Min/Min}-organoidkultur som ett modellsystem. Etableringen av organoidkultur lyckades genom att odla organoiderna först i ENR-media och därefter byta till EN-media och selektivt växa mutanta APC^{Min/Min}-organoider (sfäroider). Odlingen av organoiderna var mycket tidskrävande, vilket påverkade fortsatta RT-qPCR experiment som därför kunde upprepas endast två gånger.

Därefter undersöktes Wnt-signalerings-, GDNF-RET-signalerings- och stamcellsmarkörernas genuttryck i sfäroiderna. Resultaten från RT-qPCR tyder på att Wnt-signaleringen är uppreglerad i sfäroiderna medan mRNA-uttrycket av stamcellsmarkörer, Gfra3 och RET är nedreglerad i sfäroiderna jämfört med

vildtypsorganoiderna. Dessutom undersöktes genuttrycket av markörer för differentierade celler. Resultaten tyder på att mRNA-uttrycket av markörerna för differentierade celler är nedreglerade i sfäroiderna jämfört med vildtypsorganoiderna.

För att undersöka om GDNF-RET-signalering påverkar sfäroiderna behandlades de med rekombinant GDNF och Gfr α 1 eller med RET-hämmaren Pz-1. Resultaten påvisar att GDNF-RET-signalering har ingen effekt på sfäroidernas proliferation eller storlek. RT-qPCR utfördes på sfäroiderna som behandlades med GDNF-Gfr α 1 eller med Pz-1. Resultaten tyder på att genuttrycket av varken Wnt-signaleringsmarkörerna, stamcellsmarkörerna eller markörerna för differentierade celler förändras när sfäroiderna behandlas med GDNF-Gfr α 1 eller med Pz-1. Största delen av de olika GFL:s och GFR:s genuttryck detekterades inte i RT-qPCR-experimenten. Detta kunde antyda på att GDNF-RET-signalering uttrycks endast i några av tarmens epitelceller och inte nådde metodens detektionsgräns. Det är välkänt att under tumörutveckling kan signaleringsräckornas aktivitet förändras samt gener muteras som kan antingen aktivera eller inaktivera genens funktion. RET är en välkänd proto-onkogen som har påvisats vara förknippad i olika cancertyper. Dessutom har RET föreslagits som en tumörsuppressorgen i tjocktarmscancer (Luo et al., 2013). Även om resultaten i detta pro gradu-projekt inte påvisar att GDNF-RET-signalering skulle ha en påverkan på APC-muterat tarmepitel, är det möjligt att de olika komponenterna i signaleringsräckan kunde främja eller hämma tumörutvecklingen i tarmen.

I detta pro gradu-projekt var målet även att utveckla en fungerande metod för att transducera GDNF-överuttryckande plasmid till möss med hjälp av AAV. Experimentet påbörjades med ett pilotexperiment med GFP för att undersöka vilken viral serotyp som fungerar bäst för att transducera GDNF-plasmiden. Serotypernas effektivitet och lokalisering undersöktes med hjälp av AAV-medierad genöverföring av GFP till mustarmen. Serotyp 8 och 9 undersöktes i detta projekt. Resultaten antyder att serotyp 9 är en bättre kandidat än serotyp 8 för transduktion av GDNF-överuttryckande plasmiden. Dock varierade lokaliseringen av GFP i både tunn- och tjocktarmen.

I fortsatta studier borde RT-qPCR-experimenten upprepas för att klargöra om GDNF-RET-signalering förändras i sfäroider samt hur GDNF-RET-signalering påverkar

APC-muterat tarmepitel. Dessutom skulle det vara intressant att jämföra genuttrycket av markörer för differentierade celler i APC^{Min/+}-organoider med APC^{Min/Min}-sfäroider. Detta kunde bekräfta om differentierade celler minskar på grund av inaktiverad APC-gen. Därtill skulle det vara intressant att ytterligare undersöka uttrycket av GFL:er och GFR:er på proteinnivå i sfäroiderna med hjälp av Western blot-analys. Dessutom skulle immunohistokemiska experiment vara intressanta att utföra på sfäroiderna för att undersöka GDNF-RET-signaleringens påverkan på tarmepitelet. Eftersom forskning av GDNF-RET-signalering i tjocktarmscancer är relativt nytt behövs det studier som utreder var och hur GDNF-RET-signalering sker i tarmen samt om det har en påverkan inom tjocktarmscancer.

7 Tillkännagivande

Jag vill rikta ett stort tack till Saara Ollila för möjligheten att fått arbeta i hennes labb och den goda handledningen under hela mitt pro gradu-projekt. Jag vill även tacka biträdande professor Diana Toivola som fungerat som min handledare på Åbo Akademi för den hjälp jag fått under pro gradu-projektet i sammanställning av data och skrivandet. Jag vill även tacka alla medlemmar i Ollilas och Tomi Mäkeläs forskningsgrupper, speciellt Oriane Vedrines och Toni Lemmetyinen för de intressanta diskussionerna och för att de alltid stödde mig i mitt labbarbete.

Dessutom vill jag tacka mina studievänner Lisa, Linn, Jenny, Janni, Lucinda, Pernilla, Maxi, Linus, Lasse och Kalle som gjorde mina år i Åbo oförglömliga. Det lever ännu en gummistövelbiolog inne i mig tack vare er. Ett stort tack även till Taru, Sandra, Vilma och Niklas som jag fick känna senare under studietiden. Tack vare allt det vi har upplevt har jag fått vänner för livet. Jag vill tacka speciellt dig Taru som nu är min fästmö för all det stöd du har gett mig under de åren vi känt varandra och utan dig skulle jag inte ha vågat byta mitt huvudämne till cellbiologi eller fått min avhandling skrivet.

Slutligen vill jag tacka mina vänner från Helsingfors Jani, Jokke, Fleege och Keke som gjorde det möjligt att kunna avkoppla alltid då och då från studierna. Också ett stort kärleksfullt tack till min familj för all uppmuntran och stöd samt som kämpat mig framåt.

8 Litteraturförteckning

- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), 383–394.
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, 39(9), 677–696.
- Anders, J., Kjær, S., & Ibáñez, C. F. (2001). Molecular Modeling of the Extracellular Domain of the RET Receptor Tyrosine Kinase Reveals Multiple Cadherin-like Domains and a Calcium-binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35808–35817.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683–691.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., ... Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003–1007.
- Bayliss, W. M., & Starling, E. H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of physiology*, 24(2), 99–143.
- Bertario, L., Russo, A., Sala, P., Eboli, M., Radice, P., Presciuttini, S., ... Spinelli, P. (1999). Survival of patients with hereditary colorectal cancer: Comparison of HNPCC and colorectal cancer in FAP patients with sporadic colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 80(2), 183–187.
- Beumer, J., Artegiani, B., Post, Y., Reimann, F., Gribble, F., Nguyen, T. N., ... Clevers, H. (2018). Enteroendocrine cells switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient. *Nature cell biology*, 20(8), 909–916.
- Boron, W., F., & Boulpaep, E., L. (2012) *Medical physiology: a cellular and molecular approach*: 2 uppl. Philadelphia: Saunders, kap 44, 1753–1757.
- Buczacki, S. J. A., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D. J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing *Lgr5*. *Nature*, 495(7439), 65–69.
- Carmon, S. K., Lin, Q., Gong, X., Thomas, A., & Liu, Q. (2012). LGR5 Interacts and Cointernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/ β -Catenin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 32(11), 2054–2064.
- Chen, Y. H., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2018). Adeno-Associated Virus Production, Purification, and Titering. *Current Protocols in Mouse Biology*, e56.

- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205.
- Cotter, M., J., & Muruve, D., J. (2005). The induction of inflammation by adenovirus vectors used for gene therapy. *Frontiers in Bioscience*, 10(1–3), 1098.
- Cramer, J. M., Thompson, T., Geskin, A., LaFramboise, W., & Lagasse, E. (2015). Distinct human stem cell populations in small and large intestine. *PloS one*, 10(3), e0118792.
- Dazard, J. E., Sandlers, Y., Doerner, S. K., Berger, N. A., & Brunengraber, H. (2014). Metabolomics of ApcMin/+ mice genetically susceptible to intestinal cancer. *BMC systems biology*, 8, 72.
- De la Cour, C. D., Norlén, P., & Håkanson, R. (2007). Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: A microdialysis study. *Regulatory Peptides*, 143(1-3), 118–126.
- Fair, K. L., Colquhoun, J., & Hannan, N. R. F. (2018). Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1750), 20170217.
- Farrall, A. L., Riemer, P., Leushacke, M., Sreekumar, A., Grimm, C., Herrmann, B. G., & Morkel, M. (2012). Wnt and BMP signals control intestinal adenoma cell fates. *International Journal of Cancer*, 131(10), 2242–2252.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 153–173.
- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 38(7), 867–871.
- Furness, J. B. (2006). *The Enteric Nervous System*. Oxford: Blackwell, Chapter 1, 1–28.
- Gattei, V., Celetti, A., Cerrato, A., Degan, M., De Iuliis, A., Rossi, F. M., ... Grieco, M. (1997). Expression of the RET Receptor Tyrosine Kinase and GDNFR- α in Normal and Leukemic Human Hematopoietic Cells and Stromal Cells of the Bone Marrow Microenvironment. *Blood*, 89(8), 2925–2937.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., ... Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529(7585), 226–230.

- Ghoncheh, M., Mohammadian, M., Mohammadian-Hafshejani, A., & Salehiniya, H. (2016). The Incidence and Mortality of Colorectal Cancer and Its Relationship With the Human Development Index in Asia. *Annals of Global Health*, 82(5), 726.
- Gillen, C. D., Walmsley, R. S., Prior, P., Andrews, H. A., & Allan, R. N. (1994). Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*, 35(11), 1590–1592.
- Golden, J. P., Baloh, R. H., Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Osborne, P. A., Milbrandt, J. & Johnson, E. M. Jr. (1998). Expression of neurturin, GDNF, and their receptors in the adult mouse CNS. *Journal of Comparative Neurology*, 398, 139–150.
- Giovannucci, E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 31(4), 925–943.
- Kaemmerer, E., Jeon, M. K., Berndt, A., Liedtke, C., & Gassler, N. (2019). Targeting Wnt Signaling via Notch in Intestinal Carcinogenesis. *Cancers*, 11(4), 555.
- Katoh, M., & Katoh, M. (2007). WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clinical Cancer Research*, 13(14), 4042–4045.
- Khashab, M., Pickhardt, P., Kim, D., & Rex, D. (2009). Colorectal anatomy in adults at computed tomography colonography: normal distribution and the effect of age, sex, and body mass index. *Endoscopy*, 41(08), 674–678.
- Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 30(2), 145–159.
- Kim, S. O., Kim, J., Okajima, T., & Cho, N. J. (2017). Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano convergence*, 4(1), 5.
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12(5), 319–330.
- King, I. S., Paterson, J. Y., Peacock, M. A., Smith, M. W., & Syme, G. (1983). Effect of diet upon enterocyte differentiation in the rat jejunum. *The Journal of Physiology*, 344(1), 465–481.
- Köks, S., Dogan, S., Tuna, B. G., González-Navarro, H., Potter, P., & Vandenbroucke, R. E. (2016). Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 160, 41–53.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75.

- Koshida, S., Kobayashi, D., Moriai, R., Tsuji, N., & Watanabe, N. (2007). Specific overexpression of OLFM4/GW112/hGC?1 mRNA in colon, breast and lung cancer tissues detected using quantitative analysis. *Cancer Science*, 98(3), 315–320.
- Krishnamurthy, N., & Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer treatment reviews*, 62, 50–60.
- Leblond, C. P., & Stevens, C. E. (1948). The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *The Anatomical Record*, 100(3), 357–377.
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 315–337.
- Liu, W., Li, H., Hong, S., Piszczek, G., P., Chen, W., & Rodgers, G., P. (2016). Olfactomedin 4 deletion induces colon adenocarcinoma in *Apc^{Min/+}* mice. *Oncogene*, 35, 5237–5247.
- Luo, Y., Tsuchiya, K. D., Il Park, D., Fausel, R., Kannigurn, S., Welch, P., ... Grady, W. M. (2013). RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene*, 32(16), 2037–2047.
- Markakis, E. A., Vives, K. P., Bober, J., Leichtle, S., Leranthe, C., Beecham, J., ... Redmond, D. E., Jr (2010). Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(3), 588–593.
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 361(25), 2449–2460.
- Mori, H., & Cardiff, R. D. (2016). Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. *The Tumor Microenvironment*, 1–12.
- Morin, P. J., Kinzler, K. W., & Sparks, A. B. (2016). β -Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics. *Cancer Research*, 76(19), 5587–5589.
- Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., McNeely, M. K., Shoemaker, A. R., & Dove, W. F. (1995). *ApcMin*: A Mouse Model for Intestinal and Mammary Tumorigenesis. *European Journal of Cancer*, 31(7–8), 1061–1064.
- Moser, A. R., Mattes, E. M., Dove, W. F., Lindstrom, M. J., Haag, J. D., & Gould, M. N. (1993). *ApcMin*, a mutation in the murine *Apc* gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 8977–8981.

- Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2017). Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(2), 110–116.
- Mustata, R. C., Vasile, G., Fernandez-Vallone, V., Strollo, S., Lefort, A., Libert, F., ... Garcia, M.-I. (2013). Identification of Lgr5-Independent Spheroid-Generating Progenitors of the Mouse Fetal Intestinal Epithelium. *Cell Reports*, 5(2), 421–432.
- Nalbantoglu, I., Blanc, V., & Davidson, N. O. (2016). Characterization of Colorectal Cancer Development in *Apc* (min/+) Mice. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1422, 309–327.
- Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., & Milbrandt, J. (2006). Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate1. *Biology of Reproduction*, 74(2), 314–321.
- Neo, J. H., Ager, E. I., Angus, P. W., Zhu, J., Herath, C. B., & Christophi, C. (2010). Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC cancer*, 10, 134.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C. L., ... Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(5), G1028–G1036.
- Ogaki, S., Shiraki, N., Kume, K., & Kume, S. (2013). Wnt and Notch Signals Guide Embryonic Stem Cell Differentiation into the Intestinal Lineages. *STEM CELLS*, 31(6), 1086–1096.
- Perea, D., Guiu, J., Hudry, B., Konstantinidou, C., Milona, A., Hadjieconomou, D., ... Miguel-Aliaga, I. (2017). Ret receptor tyrosine kinase sustains proliferation and tissue maturation in intestinal epithelia. *The EMBO Journal*, 36(20), 3029–3045.
- Petrova, T. V., Nykänen, A., Norrmén, C., Ivanov, K. I., Andersson, L. C., Haglund, C., ... Alitalo, K. (2008). Transcription Factor PROX1 Induces Colon Cancer Progression by Promoting the Transition from Benign to Highly Dysplastic Phenotype. *Cancer Cell*, 13(5), 407–419.
- Pollard, M. F., Thompson-Fawcett, M. W., & Stringer, M. D. (2011). The human ileocaecal junction: anatomical evidence of a sphincter. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 34(1), 21–29.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426.
- Rao, M., & Gershon, M. D. (2018). Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? *Nature Reviews Neuroscience*, 19(9), 552–565.

- Rao, T. P., & Kuhl, M. (2010). An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circulation Research*, 106(12), 1798–1806.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1473), 1545–1564.
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843–850.
- Rio, D. C. (2014). Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(11), pdb.prot080887.
- Saladin, K. S. (2018). *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. 8th edition. New York: McGraw-Hill Education, Chapter 25, 943–985.
- Salganik, M., Hirsch, M., L., & Samulski, R., J. (2014). Adeno- associated virus as a mammalian DNA vector. *Microbiol Spectrum*, 3(4): MDNA3-0052-2014.
- Sand, O., Sjaastad Ö. V., Haug, E., & Bjälle, J. G. (2006) *Människokroppen: Fysiologi och anatomi*. 2 uppl. Stockholm: Liber, kap 13, 380–419.
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., ... Winton, D. J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes & development*, 18(12), 1385–1390.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., ... Clevers, H. (2010). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415–418.
- Shroyer, N. F., Wallis, D., Venken, K. J., Bellen, H. J., & Zoghbi, H. Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes & development*, 19(20), 2412–2417.
- Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., ... Clevers, H. (2010). Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell*, 143(1), 134–144.
- Spit, M., Koo, B.-K., & Maurice, M. M. (2018). Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open Biology*, 8(9), 180120.
- Szigethy, E., Knisely, M., & Drossman, D. (2018). Opioid misuse in gastroenterology and non-opioid management of abdominal pain. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(3), 168–180.
- Takahashi, M. (2001). The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(4), 361–373.

- Thompson, C. M., Proctor, D. M., Suh, M., Haws, L. C., Kirman, C. R., & Harris, M. A. (2013). Assessment of the mode of action underlying development of rodent small intestinal tumors following oral exposure to hexavalent chromium and relevance to humans. *Critical reviews in toxicology*, 43(3), 244–274.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), 255–259.
- Van der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71(1), 241–260.
- Van Es, J. H., Wiebrands, K., López-Iglesias, C., van de Wetering, M., Zeinstra, L., van den Born, M., ... Clevers, H. (2019). Enteroendocrine and tuft cells support Lgr5 stem cells on Paneth cell depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201801888.
- Vanhooren, V., & Libert, C. (2013). The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 8–21.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., ... Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532.
- Wallach, T. E., & Bayrer, J. R. (2017). Intestinal Organoids: New Frontiers in the Study of Intestinal Disease and Physiology. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 64(2), 180–185.
- Whitcomb, D. C., & Lowe, M. E. (2007). Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(1), 1–17.
- Worley, D. S., Pisano, J. M., Choi, E. D., Walus, L., Hession, C. A., Cate, R. L., ... Birren, S. J. (2000). Developmental regulation of GDNF response and receptor expression in the enteric nervous system. *Development*, 127(20), 4383– 4393.
- Wu, Z.-Q., Brabletz, T., Fearon, E., Willis, A. L., Hu, C. Y., Li, X.-Y., & Weiss, S. J. (2012). Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11312–11317.
- Yan, K. S., Chia, L. A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., ... Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 466–471.
- Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2011). Olfactomedin 4, a novel marker for the differentiation and progression of gastrointestinal cancers. *Neoplasma*, 58(1), 9–13.

- Zeineldin, M., & Neufeld, K. L. (2013). More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochimica et biophysica acta*, 1836(1), 80–89.
- Zhong, X.-Y., Yu, T., Zhong, W., Li, J.-Y., Xia, Z.-S., Yuan, Y.-H., ... Chen, Q.-K. (2015). Lgr5 positive stem cells sorted from small intestines of diabetic mice differentiate into higher proportion of absorptive cells and Paneth cells in vitro. *Development, Growth & Differentiation*, 57(6), 453–465.

Bilaga 1: Kemikalier och ämnen

Advanced DMEM/F-12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Agaros	Bioline, London, Storbritannien
B27	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNA-laddningsfärg	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA 0,5M pH 8.0	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Etanol	VWR chemicals, Radnor, PA, USA
Etidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GDNF	Icosagen, Tartu, Estland
Gfra1	Icosagen, Tartu, Estland
Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hoescht 33342	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hepes (pH 7.4)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KMF-PBS	Corning, NY, USA
Matrigel	Corning, NY, USA
MgCl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
N-Acetyl-L-cysteine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NGS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Noggin	Peptidech, Rocky Hill, NJ, USA
N2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS tabletter	Medicago AB, Uppsala, Sverige
Pen-Strep	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pz-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Random hexameres	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
rMoMuLV	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
R-spondin 1	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
Target Retrieval Solution	Agilent, Santa Clara, CA, USA
TBE	Medicago AB, Uppsala, Sverige
TBS tabletter	Medicago AB, Uppsala, Sverige
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Trypan blå	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylene	Fisher scientific, Hampton, NH, USA
10x Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Primära antikroppar

kanin anti- β III tubulin	Abcam, Cambridge, England
höna anti-gfp	Abcam, Cambridge, England

Sekundära antikroppar

Alexa Fluor anti-kanin 488	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor anti-höna 594	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Primrar för PCR

Apcmin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
--------	-----------------------------------

Primrar för RT-qPCR

Artemin	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Axin2	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
β -aktin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
ChgA	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
GDNF	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Gfra1	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Gfra2	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Gfra3	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Gfra4	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Lgr5	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lyz1	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Neurturin	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Nts	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Olfm4	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Persefin	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Prox1	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
RET	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland
Tac1	Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland

Bilaga 2: Recept

1 % Agarosgel

- | | |
|-------------------|--------|
| • Agaros | 1,5 g |
| • 1 X TBE buffert | 150 ml |
| • Etidiumbromid | 4 µl |

Basal-media

- | | |
|----------------------|---------------------------------------|
| • Advanced DMEM/F-12 | 500ml |
| • Hepes (pH 7.4) | 5 ml (10 mM) |
| • Glutamax | 5 ml (2 mM) |
| • Pen-Strep | 5ml (Pen: 100 U/ml, Strep: 100 µg/ml) |
| • N2 | 5ml (1X) |
| • B27 | 10ml (1X) |

Kryptmedia (10 ml)

- | | |
|-------------------|-------------------|
| • Basal-media | 10 ml |
| • Y-compound | 10 µl (10 µM) |
| • n-acetylcystein | 10 µl (1 µM) |
| • EGF | 5 µl (50 ng/ml) |
| • Noggin | 10 µl (100 ng/ml) |
| • R-spondin 1 | 20 µl (500 ng/ml) |

EN-media (10 ml)

- | | |
|--------------------|-------------------|
| • Basal-media | 10 ml |
| • n-acetylcysteine | 10 µl (1 µM) |
| • EGF | 5 µl (50 ng/ml) |
| • Noggin | 10 µl (100 ng/ml) |

ENR-media (10 ml)

- | | |
|--------------------|-------------------|
| • Basal-media | 10 ml |
| • n-acetylcysteine | 10 µl (1 µM) |
| • EGF | 5 µl (50 ng/ml) |
| • Noggin | 10 µl (100 ng/ml) |
| • R-spondin 1 | 20 µl (500 ng/ml) |

10mM EDTA (500 ml)

- | | |
|--------------------|--------|
| • 0,5M EDTA pH 8.0 | 10 ml |
| • PBS | 500 ml |

Bilaga 3: Protokoll

Protokoll för organoidkultur (eng)

1. Euthanize a mouse, remove small intestine. Remove as much mesentery as possible. Place desired section of the intestine on 50ml Falcon tube containing PBS on ice.
2. Using 10 ml syringe and gavage needle, rinse the intestinal lumen with ice cold PBS until intestine appears white/pink. Collect intestine on the gavage needle. Remove the remaining mesentery.
3. Open the intestine longitudinally (rip open) and place on a petri dish on ice. Gently rub between fingers in cold PBS to remove mucus. Change PBS 1-3 times and repeat rubbing.
4. Pour away excess PBS and cut the small intestine into 3 mm fragments with small scissors.
5. Place the fragments into a 50 ml Falcon tube and add 20-30 ml PBS. Shake gently, let the tissue pieces settle and discard supernatant. Add about 20ml PBS with 10mM EDTA. Shake gently, let tissue pieces settle and discard supernatant. Fill the tube until 30 ml with fresh 10mM EDTA and place horizontally on ice.
6. During the next 45 minutes change the PBS-EDTA three times. Shake gently (10sec) during each change, pipet away foam and let the pieces settle before discarding the supernatant.
7. After last shaking, resuspend the fragments again with ice cold 30ml PBS/EDTA (10mM) and incubate horizontally (intermittently gently shake) 60min on ice.
8. After total of 1h45min of PBS-EDTA, shake the tube for 15 sec and pour the contents through a 70-um mesh into a 50 ml Falcon tube. Add fresh PBS-EDTA on tissue pieces and repeat shaking and filtering to get in total 40-50ml crypt-containing PBS-EDTA buffer.
9. Spin the crypts 200g 2 min. If unsuccessful, spin faster but note that the faster you spin, more the crypts will suffer. In that case shake more crypts away from tissue pieces. It's important to have a visible pellet. Tissue pieces can be re-shaken for more crypts until 2h of EDTA incubation.
10. Suspend the pellet to 2-3ml of PBS (wash out the EDTA)
11. Spin again to collect the crypts.
12. Remove supernatant and suspend the pellet to a desired volume of crypt media (usually 300-500ul). Check the density under microscope and dilute further if necessary.
13. For organoid culture, plate 24 µl domes in 48-well plates. Culture crypts in 75% Matrigel mixed with 25% media. After plating, let Matrigel solidify in 37C incubator for 15min. Overlay with 350 µl media. Change fresh media every 2 or 3 days.